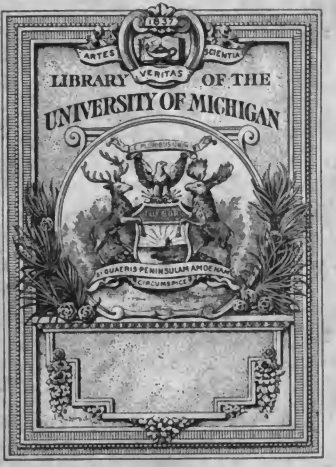
B 611816 DUPL

Svante Arrhenius

Immunochemie

Digitized by Google



Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

IMMUNOCHEMIE.

Anwendungen der physikalischen Chemie auf die Lehre von den physiologischen Antikörpern

von

SVANTE ARRHENIUS.

Mit Unterstützung des Verfassers aus dem engl. Manuskript übersetzt

von

ALEXIS FINKELSTEIN.

Leipzig
Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H.
1907.

Digitized by Google

Published 24th Dez. 1906
Privilege of Copyright in the United States reserved under the Act approved March 3, 1905 by Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H. Leipzig.

Digitized by Google

Vorwort.

Die folgenden Blätter geben den Inhalt einer Reihe von sechs Vorlesungen wieder, die im vergangenen Sommersemester (1904) an der Universität von Kalifornien in Berkeley gehalten wurden.

Der Gegenstand dieser Vorlesungen war die Anwendung der physikalischen Chemie auf die Theorie der Toxine und Antitoxine. Der Gedanke, daß die gegenseitige Einwirkung der Toxine und Antitoxine von derselben Natur wie eine chemische Neutralisation ist, scheint beinahe ebenso alt zu sein, wie das Studium dieser Erscheinungen überhaupt, das im Jahre 1890 durch Behrings und Kitasatos Entdeckung des Diphtherie-Antitoxins eingeleitet wurde. Besonders brachte die Deutsche Schule unter Führung Ehrlichs, des berühmten Leiters des Preußischen staatlichen Seruminstituts in Frankfurt am Main, viel Material zur Begründung der Ansicht bei, daß die gegenseitige Einwirkung der Toxine und Antitoxine chemischer Natur ist, während die Französische Schule, geführt von Metschnikoff, zu zeigen versuchte, daß die Wirkung der Antitoxine hauptsächlich physiologischer Natur sei; sie sollten die organischen Gewebe in ihrem Kampf gegen den Angriff der Gifte sozusagen anreizen.[1])

Als es Ehrlich gelang, zu zeigen, daß die agglutinierende Wirkung des Ricins auf rote Blutkörperchen (Erythrocyten), die in physiologischer Salzlösung (0,9 % Na Cl) aufgeschwemmt sind, durch seinen Antikörper, das Antiricin, aufgehoben wird, wurde die Ansicht, daß die Antikörper eine physiologische Wirkung ausüben, von den meisten Forschern verlassen. Obwohl ich die Ansicht der chemischen Schule teile, kann ich nicht sagen, daß Ehrlichs Beweis ganz einwandsfrei ist, denn die Erythrocyten können wohl noch als lebend betrachtet werden, wenn sie auch von dem Blute des Tieres getrennt sind. Eine andre

[1]) Die ersten Arbeiten in dieser Richtung stammen von Buchner (Münch. med. Wochenschr. 1893, 3, 480) und Roux und Vaillard (Ann. de l'inst. Pasteur, 8, 724 (1894).

16:035

Digitized by Google

von Ehrlich festgestellte Tatsache, daß nämlich die n-fache Menge eines Giftes annähernd die n-fache Menge des Antitoxins zur Neutralisation erfordert, kann eher als ein mit der physiologischen Hypothese schwer vereinbares Faktum angesehen werden. Das mag nun sein wie es will, die chemische Hypothese ist jetzt allgemein angenommen, was sich neuerdings darin gezeigt hat, daß Bordet ihr beigetreten ist, der ursprünglich ähnliche Ideen wie Metschnikoff verfochten hat.

Aber es blieben noch viele Schwierigkeiten innerhalb der chemischen Theorie zurück. Nichts konnte näher liegen, als einen Ausweg daraus mit Hilfe der modernen Theorien der Lösungen zu suchen. Zu diesem Zwecke forderten mich Madsen und Ehrlich auf, an ihren Arbeiten teilzunehmen. Meine Arbeit mit Madsen in Kopenhagen setzte uns instand, eine einfache Erklärung der Hauptschwierigkeit zu geben, die das sogenannte Ehrlichsche Phänomen darbot. Der Leiter des Frankfurter Institutes interessierte sich so lebhaft für diesen Fortschritt, daß er mich einlud, in seinem Institute über das chemische Verhalten zusammengesetzter Hämolysine zu arbeiten. Es zeigte sich, daß auch hier die Gesetze des chemischen Gleichgewichts Anwendung fanden. Es schien daher, als ob die Verfechter der chemischen Hypothese durchaus zufrieden mit diesen Resultaten hätten sein können.

Indessen, einer jener sonderbaren Zufälle, an denen die Geschichte der Wissenschaft so reich ist, trat ein. Bei der Erklärung der studierten Erscheinungen, besonders derer, die das Diphtherietoxin betrafen, versuchten Madsen und ich so wenige Hypothesen wie möglich zu benutzen, getreu der allgemeinen Regel der exakten Wissenschaften, und für diesen Gegenstand dem Beispiele Bordets folgend. Wir versuchten zu zeigen, daß die beobachteten Erscheinungen durch die Annahme zu erklären waren, daß das Diphtheriegift eine einfache Substanz ist, die sich langsam in einen unschädlichen, aber Antitoxin noch neutralisierenden Stoff umsetzt. Zu demselben Zwecke hatte Ehrlich vorher im Diphtheriegift die Anwesenheit einer großen Anzahl giftiger Substanzen von verschiedener Stärke angenommen. Nun wollte Ehrlich diese Erklärung, die er für den wichtigsten Bestandteil seiner Lehre hält, nicht aufgeben, und deshalb erhoben er und seine zahlreichen Schüler eine Anzahl Einwände gegen die Behandlung dieses Forschungsgebietes nach den modernen Theorien der Chemie. So kam es, daß Biltz, von Ehrlich angeregt, Bordets alte Vorstellung aufnahm und ausarbeitete, die dieser hervorragende Gelehrte zugunsten der chemischen Hypothese aufgegeben hatte: er behauptete, das Antitoxin reagiere nicht chemisch mit dem Toxin,

Digitized by Google

sondern verhielte sich annähernd in der Art eines Farbstoffes, der von der Faser fixiert wird.

Einige neue Einwände gegen die in diesen Vorlesungen niedergelegten Gedanken sind berücksichtigt worden, obwohl sie erst später erschienen sind, als die Vorträge gehalten wurden. Aus denselben Gründen sind einige neue, teilweise noch unveröffentlichte Arbeiten von Madsen und seinen Schülern, hauptsächlich die Reaktionsgeschwindigkeit betreffend, in den folgenden Seiten mit benutzt worden.

Einige interessante Versuchsreihen über Präzipitine, die Hamburger jüngst ausgeführt hat, sind ebenfalls wegen ihrer großen Bedeutung aufgenommen.

Ich habe diesen Vorlesungen den Titel „Immunochemie" gegeben, und möchte mit diesem Worte ausdrücken, daß auf den folgenden Blättern die chemischen Reaktionen von Substanzen untersucht sind, die durch Einspritzung fremder Stoffe in das Blut von Tieren, d. h. durch „Immunisierung", erzeugt werden. Daraus folgt, daß auch die Substanzen, mit denen diese Produkte reagieren, wie Proteine und Fermente, in den Kreis der Betrachtung gezogen sind, was ihr chemisches Verhalten betrifft. Auch andere ähnlich wirkende Substanzen sind zur Erläuterung mit behandelt.

Es ist unleugbar, daß der neuerdings von Sachs und Ehrlich gegen diese Art der Behandlung erhobene Einwand, nämlich daß sie nicht auf die Art eingeht, in der das lebende Tier die sogenannten Antikörper produziert, ganz richtig ist. Aber ich stelle mir vor, daß es viele Leute geben mag, die sich für das chemische Verhalten dieser Substanzen tief genug interessieren, um eine Erforschung dieser Fragen der Mühe wert zu halten, und ich glaube sogar, daß die von Ehrlich hervorgehobene physiologische Seite des Problems keine befriedigende Lösung wird finden können, ehe nicht die einfachere chemische Seite aufgeklärt ist.

Der Hauptzweck theoretischer Überlegungen ist, klare und bestimmte Vorstellungen von den beobachteten Wirkungen zu geben. Dadurch spornen sie in hohem Maße zu wissenschaftlichen Untersuchungen an. Ich hoffe, daß der Leser der folgenden Seiten finden wird, daß die von mir in dieses Gebiet der Wissenschaft eingeführten theoretischen Ansichten in den wenigen Jahren ihrer Anwendung ihren Platz in einer sehr befriedigenden Weise ausgefüllt haben. Ich freue mich, sagen zu können, daß in diesen wenigen Jahren ein reiches experimentelles Material beschafft worden ist, das zeigt, daß die Hauptlinien, die die Theorie angibt, fast mit der Wirklichkeit zusammenfallen, und daß dieses Material fast ausschließlich zu dem Zweck

Digitized by Google

gesammelt worden ist, gerade diese theoretischen Betrachtungen zu prüfen. Sie haben daher schon viel Nutzen in der Wissenschaft gestiftet und doch ist es erst ein kleiner Teil dessen, was sich erwarten läßt. Der Leser wird häufig Gelegenheit haben, die wissenschaftlichen Tatsachen mit den hier auseinandergesetzten theoretischen Anschauungen und nebenbei mit den aus anderen Betrachtungen abgeleiteten zu vergleichen.

Meinen zahlreichen kalifornischen Freunden mögen, so hoffe ich, diese Zeilen die schöne Zeit zurückrufen, die ich in ihrer Mitte in ihrem angenehmen Lande zu verbringen die Freude hatte.

Stockholm, März 1906.

Svante Arrhenius.

Digitized by Google

Inhalt.

Kapitel 1: Einleitung . . . . . S. 1
Kapitel 2: Reversibilität der Bindungsvorgänge . . . . . S. 12
Kapitel 3: Reaktionsgeschwindigkeiten. Homogene Systeme . . . . S. 24
Kapitel 4: Reaktionsgeschwindigkeiten. Heterogene Systeme . . . . S. 65
Kapitel 5: Gleichgewichte bei Absorptionsprozessen . . . . . S. 93
Kapitel 6: Neutralisation der hämolytischen Eigenschaften von Basen und von Lysinen bakteriellen Ursprungs . . . . . S. 109
Kapitel 7: Neutralisation von Diphtherietoxin, Ricin, Saponin und Schlangengiften . . . . . S. 128
Kapitel 8: Die zusammengesetzten Hämolysine . . . . . S. 142
Kapitel 9: Die Präzipitine . . . . . S. 172

Digitized by Google

Digitized by Google

Kapitel 1. Einleitung.

Die sogenannten „Antikörper", die von den Tieren nach Injektion einer mehr oder weniger giftigen Substanz gebildet werden, sind in letzter Zeit zu großer Bedeutung gekommen. Daher ist ihr chemisches Verhalten der Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. Darunter führten einige zu der Vorstellung, daß die Reaktionen dieser Substanzen unvollständig sind und dem Gesetz von Guldberg und Waage gehorchen. Diese Untersuchungen, die hauptsächlich von dem Direktor des Dänischen Serum-Institutes, Dr. Thorwald Madsen, und von mir ausgeführt worden sind, sind der Gegenstand, über den ich in den folgenden Vorlesungen einen kurzen Überblick geben möchte.

Es gibt nur wenige Gifte, deren Antitoxine dargestellt worden sind. Diese Gifte werden Toxine genannt. Sie sind alle organischen Ursprungs. Bashford[1]) und Besredka[2]) haben sich vergebens bemüht, Antitoxine gegen Solanin und Saponin darzustellen, indem sie diese Substanzen Kaninchen und Meerschweinchen injizierten; ihre Versuche hatten keinen Erfolg. Auch das Antitoxin gegen Morphin, das sogenannte Antimorphin, das dargestellt wurde, hat sich als eine Täuschung erwiesen.[3]) Solanin, Saponin und Morphin sind daher keine Toxine. Andrerseits enthält der Extrakt der Samen von Ricinus communis ein Toxin, das Ricin genannt wird, gegen das wir ein Antitoxin, Antiricin genannt, besitzen. Ebenso sind Antitoxine bekannt, die Abrin und Robin entsprechen, aus den Samen von Abrus praecatorius und Robinia pseudacacia ausgezogenen Giften. Nicht nur gegen Gifte, sondern auch gegen nahezu oder gänzlich unschädliche Körper bringen die Tiere Antikörper hervor. Auch scheint das Blut eines Tieres, in dessen Venen irgendwelche Zellen eingeführt werden, nach einiger Zeit einen Antikörper zu enthalten, der gerade diese Art Zellen zerstört. Sogar durch Injektion von Lab, das durch seine Fähigkeit,

[1]) Bashford, Über Blutimmunität, Arch. intern. de pharmacodynamie et de thérapie 8, 101 und 9, 451 (1901).

[2]) Metschnikoff, L'immunité, Paris 1901, S. 410.

[3]) Morgenroth, Berliner klin. Wochenschrift 1903, Nr. 21.

Digitized by Google

Milch gerinnen zu machen, bekannt ist, erhalten wir einen Antikörper, Antilab genannt, der die koagulierende Wirkung des Labs hindert.[1])

Es ist schwer, eine Grenze zwischen Enzymen oder Fermenten und Toxinen zu ziehen. Ebenso wie beim Lab, hat es sich auch bei vielen andren solchen Substanzen gezeigt, daß sie nach Injektion im Blut verschiedener Tiere Antikörper geben. Z. B. stellte v. Dungern[2]) auf diese Weise Antikörper gegen proteolytische Enzyme aus pathogenen Mikroben dar. Hildebrand[3]) fand auf ähnliche Weise einen Antikörper gegen das Ferment Emulsin. Gessard[4]) fand es möglich, einen Antikörper gegen Thyrosinase, eine aus Pilzen extrahierte Oxydase, darzustellen, und Sachs[5]) zeigte, daß das Serum einer Gans, der Pepsin injiziert worden war, Antipepsin enthielt. A. Schütze bereitete „Antilaktase" durch subkutane oder intramuskulare Injektion von Kefirlaktase in Kaninchen oder Hühner. Andre Antikörper sind gegen Cynarase, Fibrinferment, Pankreasferment, Zymase und Urease bereitet.[6])

Es scheint daher nur eine Frage der Zeit zu sein, wann es uns gelingen wird, allgemein Antikörper gegen Fermente und Enzyme zu bereiten.

Ein Antikörper gegen Lab ist in dem sogenannten normalen Serum des Pferdes enthalten, das ist Pferdeblut, das von seinem Fibrin durch Schütteln mit kleinen festen Körpern, wie Glasperlen oder Stückchen Eisendraht, und von den roten Blutkörperchen (oder Erythrocyten) durch Zentrifugalwirkung befreit worden ist. (Dies wurde zuerst 1887 von Hammarsten und Rödén gezeigt.) Ebenso enthalten frisches Serum und sogar Eiweiß Antikörper gegen noch viele andre Substanzen, wie z. B. Trypsin und Tetanolysin. — Das Blutserum wird als natürliches oder normales bezeichnet, wenn es von frischen, in keinerlei Art vorbehandelten Tieren erhalten worden ist. Wenn vor der Bereitung des Blutserums Fremdkörper in die Venen des Tieres injiziert worden sind, so erhalten wir im allgemeinen kein normales Serum, sondern ein Serum, das einen gegen den injizierten Körper „spezifischen" Antikörper enthält.

Um diesen merkwürdigen Gegenstand etwas klarer erscheinen zu lassen, will ich einen kurzen Überblick der Art geben, wie die

---

[1]) Morgenroth, Zentralblatt f. Bakteriologie, Abt. I, Bd. **26** und **27**.
[2]) v. Dungern, ebenda, Abt. I, Bd. **24** (1898).
[3]) Hildebrand, Virchows Archiv Bd. **131** (1893).
[4]) Gessard, Annales de l'Institut Pasteur, **15**, 607 (1901).
[5]) H. Sachs, Fortschritte der Medizin, **20**, 425 (1902).
[6]) vgl. A. Schütze, Z. f. Hygiene, **48**, 457 (1904).

Digitized by Google

Antikörper im Serum erscheinen und später wieder daraus verschwinden.

Die untenstehende Kurve zeigt die Konzentration des Cholera-Agglutinins im Blute einer Ziege, die eine gewisse Zeit vor dem Versuch mit Kulturen von Vibrio Cholerae immunisiert worden war, so daß die Konzentration des Agglutinins zu Beginn vier willkürliche Einheiten betrug. Wenn man nämlich eine Bazillenkultur, z. B. des Vibrio Cholerae, in das Blut einer Ziege injiziert, so bringt das Blut Antikörper hervor, die gerade gegen die injizierten Bazillen spezifisch sind. Unter diesen Antikörpern ist einer, der Agglutinin genannt wird, weil er bewirkt, daß die (Cholera-)Bazillen sich zusammenballen

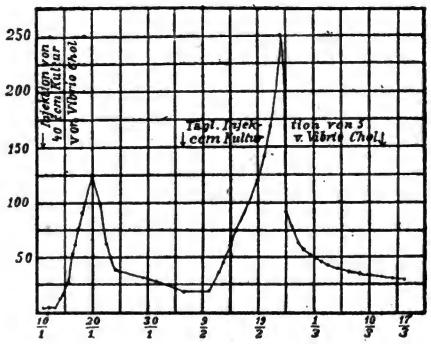


Fig. 1.

und auf den Grund der Flüssigkeit sinken, in der sie suspendiert sind. Wir können die Konzentration des Agglutinins in einer Flüssigkeit messen, nach einer Methode, die weiter unten beschrieben ist.

Die Versuche, deren Resultate die Kurve wiedergibt, sind von Madsen und Jörgensen[1]) ausgeführt an einer Ziege, der 40 ccm einer Cholerabazillenkultur subkutan eingespritzt waren. Täglich wurden kleine Mengen Blut aus der Jugularvene dieser Ziege entnommen und auf ihren Gehalt an Agglutinin geprüft. In den ersten zwei Tagen wurde keine Zunahme der Agglutininmenge im Blutserum beobachtet, aber dann nahm sie zu, bis sie am achten Tage plötzlich

[1]) A. Jörgensen und Thorwald Madsen, Das Schicksal des Typhus- und Cholera-Agglutinins. Festkrift ved invielsen af statens serum-institut VI, 12 (1902 Kopenhagen).

Digitized by Google

ein Maximum, „Akme", erreichte, worauf sie zuerst schnell, dann langsamer sank.

Die Fortsetzung der Kurve zeigt Experimente mit derselben Ziege, bei denen während der ganzen Dauer des Versuches täglich 5 ccm einer Cholerabazillenkultur eingespritzt wurden. Hier dauerte die erste Periode, während der kein Agglutinin gebildet wurde, 4 Tage, und die zweite Periode, während der es zunahm, 11 Tage.

Madsen fand, daß der Abfall nach der Akme nahezu der Gleichung für die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion folgt:

$$\text{Geschwindigkeit des Abfalls} = \text{Konst} \cdot (\text{Konzentration})^n,$$

was integriert die Formel ergibt:

$$1 : (\text{Konzentration})^{n-1} = \text{Konst}_1 + \text{Konst}_2 \cdot t,$$

wo A die seit der Akme verflossene Zeit bedeutet.

Für das von einer Ziege hervorgebrachte Cholera-Agglutinin fand Madsen $n = 3{,}5$, $\text{Konst}_1 = 0{,}082$ bzw. 0,32 und $\text{Konst}_2 = 0{,}13$ bzw. 0,032 für den ersten und zweiten Teil der oben dargestellten Kurve.

Als Beispiel gebe ich die Zahlen des zweiten Teiles zusammen mit den Resultaten der Berechnung:

t in Tagen	Konz. beob.	Konz. ber.	t in Tagen	Konz. beob.	Konz. ber.
0	250	250	8	43	43
1	91	96	10	40	40
2	77	74	12	38	37
3	63	63	14	36	35
4	56	57	16	34	33
5	52	52	18	32	31
6	49	48	20	30	30
7	46	45	22	28	29

Hier ist der Exponent n ziemlich groß, größer als in andren von Madsen[1]) untersuchten Fällen. Für Typhus-Agglutinin in Ziegen fand er $n = 1{,}3$ und $n = 1{,}5$. Die letztere Zahl ergab sich auch für Typhus-Agglutinin in Kaninchenblut.

Bomsteins Zahlen über die Menge von Diphtherie-Antitoxin im Blute von Hunden und Meerschweinchen nach direkter Injektion[2])

---

[1]) Th. Madsen, Die Abnahme der Antikörper im Organismus, Festschrift VIII, Kopenhagen 1902.

[2]) sogenannte „passive Immunisierung". „Aktive Immunisierung" wird, wie oben beschrieben, durch Injektion des Toxins oder der Zellen selbst hervorgebracht.

Digitized by Google

dieses Antikörpers in das Blut der Tiere ergaben $n = 1{,}2$. Hier ist die Konstante $Konst_2$ bei verschiedenen Hunden so nahe gleich groß, wie man erwarten kann, nämlich bei 3 Individuen 0,15, 0,18 und 0,19. Für die Zerstörung der Antikörper im menschlichen Körper fand Madsen in vielen Fällen $n = 2$.

Natürlich ist diese Formel rein empirisch. Ihre physikalische Bedeutung ist leicht zu verstehen. Die von Madsen berechneten Beispiele zeigen eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Versuch und Rechnung. Die Benutzung von Formeln bedeutete einen großen Schritt vorwärts in der Entwicklung dieses Teils der Immunitätswissenschaft. Früher hatte man sich damit begnügt, festzustellen daß die Menge des Antitoxins im Blute allmählich abnimmt, und zwar in den ersten Stadien rascher als später. Die Anwendung der Madsenschen Formel lehrt uns viel mehr. Sie zeigt, daß der Vorgang regelmäßig verläuft und treibt uns an, nach einem Grund für die Verschiedenheiten in den Werten der Konstanten n und $Konst_2$ zu suchen. Zum Beispiel, sind die verschiedenen Werte für die 3 Hunde in Bomsteins Versuchen wirklich verschieden oder beruhen die beobachteten Unterschiede nur auf Versuchsfehlern? Solche und andre Fragen drängen sich bei der Benutzung einer solchen Gleichung auf und führen zu Verbesserungen der experimentellen Methoden und zu scharfen, wohl definierten Vorstellungen über die natürlichen Vorgänge selbst. Mit Hilfe von Formeln, sie mögen empirisch oder rationell sein, wird der Fortschritt der Wissenschaft weit schneller sein als ohne diese Hilfe, und wenn das Versuchsmaterial anwächst, werden sich die empirischen Formeln wahrscheinlich in rationelle verwandeln, das will sagen, wir werden neue Naturgesetze entdecken. Es ist deshalb sehr bedauerlich, daß Bemühungen hervorgetreten sind, besonders neuerdings, die die Benutzung von Formeln aus der Behandlung der Serumtherapie verdrängen wollen. Diese Bemühungen erscheinen als der letzte verzweifelte Kampf gegen die bündigen Schlüsse, die durch die Anwendung mathematischer Methoden erhalten werden, ein Kampf, der nicht mehr lange fortgesetzt werden kann.

Die Injektion der Toxine oder Zellen in das Blut der Tiere kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden. Die gebräuchlichste ist die „intravenöse Injektion" direkt in die Venen des Tieres; als eine besondere Ausführungsart kann man die „intrakardiale Injektion" ansehen, direkt in das Herz des Tieres. Langsamer wirken die „intraperitoneale Injektion" in das Peritoneum, die „intramuskulare Injektion" und die „subkutane Injektion" unter die Haut des Tieres, bei denen der

Digitized by Google

injizierte Körper das Blut, in dem er die Bildung von Antikörpern auslöst, nur allmählich erreicht.

Die Antikörper können nach der Art der injizierten Flüssigkeit in zwei große Gruppen geteilt werden, je nachdem diese eine homogene Lösung oder eine Emulsion von Zellen, z. B. Bakterien oder roten Blutkörperchen, ist. Solche Emulsionen von Erythrocyten z. B. bereitet man sich, indem man Blut, das von seinem Fibrin befreit ist, zentrifugiert. Zwischen den zentrifugierten Blutkörperchen bleibt noch eine merkliche Menge normalen Serums zurück, das bei den meisten Vorgängen, die man studieren will, sehr stark in die Reaktion eingreifen würde. Deshalb ist es notwendig, diese Flüssigkeit wegzuwaschen, wozu man sich einer sogenannten „physiologischen Lösung", meistens 0,8—0,9prozentige Chlornatriumlösung, bedient. Eine solche Lösung hat die Eigenschaft, aufgeschwemmte Blutkörperchen und die meisten Bazillen unverändert zu lassen. In stärkeren Lösungen ziehen sich Korpuskeln und Bazillen zusammen, in schwächeren geben die Erythrozyten ihren roten Farbstoff ab und werden zu farblosen „Stromata", die Bazillen werden durch Plasmolyse oder Wasserimbibition beschädigt. Beim Waschen werden die Blutkörperchen mit der physiologischen Lösung geschüttelt, abzentrifugiert, und diese Operation wird so oft wiederholt, bis das Serum so weit wie nötig weggewaschen ist. Gewöhnlich genügen zwei bis drei Waschungen mit einer Menge Lösung, die fünfmal so groß ist als der Rückstand.

Die Antikörper, die sich nach der Injektion der homogenen Lösung eines Stoffes, z. B. eines Toxins, bilden, verbinden sich meistens mit dem injizierten Körper zu weniger schädlichen Verbindungen. Wenn diese Verbindungen in der Mischung löslich sind, so nennen wir die gebildeten Körper Antitoxine (wenigstens wenn der eingespritzte Körper giftig ist). Wenn dagegen die Verbindung unlöslich ist, so heißt der Antikörper Präzipitin. Solche Präzipitine bilden sich beispielsweise nach der Injektion verschiedener Eiweißstoffe.

Wenn die Injektion aus einer Zellenaufschwemmung besteht, so löst der gebildete Antikörper manchmal diese Zellen auf, er heißt dann Lysin. So bilden sich nach Injektion von Bakterien Bakteriolysine, die unter geeigneten Bedingungen Bakterien derselben Art, wie die eingespritzten, auflösen können. Nach Injektion von Erythrocyten bilden sich sogenannte Hämolysine, die Hämolyse bei Erythrocyten desselben Tierspecies hervorbringen, d. h. bewirken, daß der rote Farbstoff, das Hämoglobin, austritt und sich in der umgebenden Flüssigkeit löst.

In andren Fällen bilden sich, oft neben Lysinen, andre Anti-

Digitized by Google

körper, sogenannte Agglutinine, die eine Agglutination der eingespritzten Zellen zuwege bringen. Hierbei spielt die Gegenwart von Salzen eine wichtige Rolle.

Das normale Serum enthält häufig eine gewisse Menge Antikörper. So finden sich z. B. im normalen Pferdeserum oft beträchtliche Mengen von Diphtherie-Antitoxin und Antilab (vgl. S. 2). Diese Eigenschaft ist so häufig beobachtet worden, daß Ehrlich annimmt, daß in normalen Seren alle möglichen Antikörper vorhanden sind, und nur ihre Menge meistens zu klein ist, als daß sie experimentell nachweisbar wären. In vielen tierischen Säften finden wir zwei organische Substanzen, Cholesterin und Lecithin, die mit vielen injizierten Giften reagieren und daher eine wichtige Rolle als Antitoxine oder sogar als Bestandteile von Toxinen spielen.

So kann z. B. das hämolytische Gift Tetanolysin, das vom Bacillus tetani hervorgebracht wird, in seiner hämolytischen Wirksamkeit von Cholesterin gehemmt werden. Die Untersuchungen von Madsen und Walbum (vgl. Kap. 7) zeigen, daß die Verbindung dieser beiden Körper ganz frei von hämolytischen Eigenschaften ist, es verhält sich also das Cholesterin genau wie ein Antitoxin gegen Tetanolysin und auch gegen andere Lysine.

Lecithin andrerseits verbindet sich mit Kobragift unter Bildung eines Hämolysins, des Kobralysins, das schon in äußerst geringer Menge eine hämolytische Wirkung auf Erythrocyten ausübt. Das Kobragift selbst hat diese Wirkung in weit geringerem Grade.

Diese verschiedenen Körper sind oft ziemlich unbeständig, so daß sie sich von selbst zersetzen. Die Zersetzung geht bei höherer Temperatur viel rascher vor sich, als bei niederer. Man bewahrt sie daher meistens bei tiefer Temperatur auf, manchmal in gefrorenem Zustande.

Ransom[1]) hat bezüglich des Cholesterins eine sehr interessante Beobachtung gemacht. Saponin ist ein stark hämolytisches Agens. Seine Wirkung ist bedingt durch die Gegenwart von Cholesterin in den Blutkörperchen. Andrerseits schützt Cholesterin im Blutserum die Blutkörperchen vor dem Angriff des Saponins.

Weigert[2]) vergleicht das Cholesterin mit einem Blitzableiter, der seine richtige Stelle außerhalb des Hauses hat, das er schützen soll. Vom chemischen Standpunkt erklären wir die Beobachtung folgendermaßen: Die Membran der roten Blutkörperchen ist durchlässig für

[1]) Ransom, Deutsche med. Wochenschrift 1901, Nr. 13.

[2]) C. Weigert, Einige neuere Arbeiten zur Theorie der Antitoxinimmunität. Wiesbaden 1899.

Digitized by Google

Saponin, nicht aber für Cholesterin und nicht für die hämolytische Verbindung, die dieses mit Saponin bildet. Daher verteilt sich das Saponin zwischen den Blutkörperchen und dem Serum annähernd im Verhältnis ihres Cholesteringehaltes. Wenn der Anteil des Saponin-Cholesterins in den Blutkörperchen einen bestimmten Wert erreicht, so werden sie hämolysiert, sonst nicht. Nur das Gift, das in den Blutkörperchen gelöst ist, übt eine Wirkung aus, das Gift außerhalb beeinflußt sie nicht.

Der erste Schritt zur Entwicklung der Serotherapie zu einer exakten Wissenschaft bestand darin, daß Methoden gefunden wurden, um die Mengen der verschiedenen mitwirkenden Substanzen zu messen. In dieser Hinsicht hat Ehrlich ein großes Verdienst als der erste, der mit hinreichender Genauigkeit die Stärke des Diphtheriegiftes maß. Um den großen Fortschritt, den die Einführung messender Methoden durch Ehrlich bedeutete, gebührend abzuschätzen, muß man sich erinnern, daß zu der Zeit, als Ehrlich seine Arbeiten ausführte, fast alle führenden Männer es für unmöglich ansahen, die Menge der Toxine und Antitoxine zu messen. Diese Ansicht beruhte auf der großen Verschiedenheit der Wirkung, die dieselbe Giftmenge bei zwei verschiedenen Individuen derselben Tierart hervorbringt, z. B. Diphtheriegift bei Meerschweinchen. Nur das dringende praktische Bedürfnis nach Messungen der Giftstärke brachte Ehrlich dazu, die großen Schwierigkeiten zu überwinden.[1])

Ehrlichs hauptsächliche Forschungen betreffen das Diphtheriegift und sein Antitoxin. Er suchte für Meerschweinchen die letale Dosis dieses Giftes zu bestimmen, und spritzte zu diesem Zwecke einer großen Anzahl Meerschweinchen verschiedene Dosen ein, die sich in der Nähe der letalen Dosis bewegten. Es mag nun zunächst erwähnt werden, daß große Meerschweinchen im allgemeinen eine größere Giftmenge vertragen als kleine. Ehrlich nahm nun an, daß die Widerstandsfähigkeit verschiedener Individuen ihrem Gewicht proportional ist und unter dieser Voraussetzung rechnete er die Dosen auf ein „normales" Meerschweinchen von 250 g Gewicht um. Um übereinstimmende Resultate zu erhalten, fand er es nötig, Tiere von nahezu demselben Gewicht, Alter und Rasse zu verwenden. Im Sommer sind die Tiere resistenter und geben gleichmäßigere Resultate als in den anderen Jahreszeiten, wo sie offenbar unter dem Temperaturwechsel und anderen klimatischen Bedingungen leiden. Die letale

[1]) P. Ehrlich, Wertbestimmung des Diphtherieheilserums, Jena 1897; Konstitution des Diphtheriegiftes, Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 38. Ehrlich, Kossel und Wassermann, Deutsche med. Wochenschr. 1894.

Digitized by Google

Dose des Diphtherietoxins definierte Ehrlich als diejenige Menge, die subkutan injiziert, von einer großen Anzahl Meerschweinchen einen großen Teil in 3—4 Tagen tötet, während von dem Rest der Tiere etwa ebensoviel vor wie nach dieser Frist sterben. Bei dieser Meßmethode bleibt ein großer Teil des Materials, nämlich alle in kürzerer oder längerer Zeit getöteten Tiere, unberücksichtigt. Da aber die Genauigkeit der Messung merklich mit dem Material wächst, so ist es von Wichtigkeit, das ganze Material zu benutzen. Das kann auf folgende Art geschehen: Die Beobachtungen umfassen viele Fälle, bei denen höhere oder geringere Dosen als die letale eingespritzt worden sind. Diese Beobachtungen bilden ein statistisches Material, um festzustellen, wie viel Tage das „normale" Meerschweinchen nach Injektion von 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 0,9, 0,8, 0,7 usw. letaler Dose lebt. Mittels dieses statistischen Materials ist die folgende Reduktionstafel konstruiert, mit Hilfe deren alle Daten, die Meerschweinchen betreffen, berücksichtigt werden können.[1])

Tage bis zum Tod	Injizierte Letaldosen	Tage bis zum Tod	Injizierte Letaldosen
1,0	1,6	5	0,80
1,5	1,4	6	0,71
2,0	1,25	7	0,64
2,5	1,15	8	0,59
3,0	1,05	9	0,55
3,3	1,00	10	0,51
3,5	0,97	12	0,45
4,0	0,91	14	0,4

Um das statistische Material zu vermehren, schlug Madsen vor, zur Bestimmung der letalen Dose die Gewichtsabnahme der Tiere zu verwerten. Auf diese Weise ergab sich eine unabhängige Bestimmung für jede Messungsreihe.

Mit Hilfe aller dieser verschiedenen Berechnungen war es auch möglich, den wahrscheinlichen Fehler jeder einzelnen Messung zu bestimmen. Bei allen früheren Behandlungen dieser Frage war das außer acht gelassen worden, was zu einer Überschätzung der Genauigkeit führte, die oft zu Schlüssen ohne jeden soliden Grund Anlaß gab.

Als nun die letale Dose des Toxins bestimmt war, war der nächste Schritt, für die Lösungen des Antitoxins eine Vergleichseinheit zu schaffen. Zu diesem Zwecke bestimmte Ehrlich diejenige Menge

1) Arrhenius und Madsen, Le poison diphthérique, Oversigt danske vid.-selsk.-forh. Kopenhagen 1904, S. 269.

Digitized by Google

der betreffenden Lösung, die nötig war, um eine bestimmte Anzahl, z. B. 100, Letaldosen des Giftes zu neutralisieren. Die Erfahrung hat gelehrt, daß sich dieses Antitoxin viel langsamer als das Toxin zersetzt, besonders wenn es unter bestimmten Vorsichtsmaßregeln aufbewahrt wird; daher wird ein bestimmtes Diphtherie-Antitoxin-Präparat als „Einheits-Serum" angenommen, und die Wirksamkeit aller zu prüfenden Gifte und Antitoxine wird mit dieser Standardeinheit verglichen.

Ehrlich benutzte bei seinen Messungen die Annahme, daß eine Injektion der gleichen Menge freien Giftes die gleiche Wirkung hat, unabhängig von der anwesenden Menge „neutralisierten Giftes". Die Richtigkeit dieser Annahme ist neuerdings in Zweifel gezogen worden, worauf wir noch zurückkommen.

Das Diphtheriegift kann nur mittels Versuchen an lebenden Tieren gemessen werden, soweit uns bekannt ist. Viele andre Gifte dagegen können außerhalb des lebenden Körpers untersucht werden, z. B. die Hämolysine, Präzipitine und Agglutinine. Es war schon lange bei physiologischen Untersuchungen, z. B. über die Verdauung, gebräuchlich, die Vorgänge außerhalb des lebenden Körpers zu verfolgen. Ehrlich übertrug diese Methode auf das Studium der agglutinierenden Wirkung, die Ricin in Gegenwart seines Antikörpers auf Erythrocyten ausübt.[1]) Auch hier ist es möglich, verschiedene Grade der Agglutination zu unterscheiden und dadurch die anwesende Menge freien Ricins zu messen; diese Methode wurde hauptsächlich in dem Dänischen Seruminstitut ausgebildet.[2])

Die fruchtbarste Anwendung hat diese Untersuchung „in vitro" beim Studium der Hämolysine gefunden.[3]) Das zu prüfende Lysin wird einer Emulsion von 2 ccm Erythrocyten in 98 ccm physiologischer Salzlösung zugesetzt, so daß verschiedene Mengen Lysin stets auf die gleiche Menge, z. B. 8 ccm, Emulsion kommen. Vor der Mischung wird die Lysinlösung mit Wasser so weit verdünnt, daß ihr gesamtes Volumen 2 ccm wird. Die beste Art ist, die Emulsion in einem kräftigen Strahl zuzugießen, so daß sofort eine homogene Flüssigkeit entsteht. Andrenfalls ist das Lysin an manchen Stellen konzentriert und wird von den benachbarten Erythrocyten absorbiert, so daß andre Erythrocyten nahezu intakt bleiben, wenn einige Sekunden (30—60) zwischen Mischung und Umschütteln vergehen. Im allgemeinen ist die Hämolyse um so geringer, je mehr Zeit zwischen Mischen und Schütteln

[1]) Ehrlich, Fortschritte der Medizin 1897, Nr. 2.

[2]) Vgl. Jörgensen und Madsen, Festskrift VI, 6. Kopenhagen 1902.

[3]) Madsen, Über Tetanolysin, Zeitschr. f. Hygiene 32, 214. (1899). Arrhenius und Madsen, Festschrift III, 9. Kopenhagen 1902.

Digitized by Google

liegt; aus diesem Grunde können Schwankungen von 50% vorkommen. Um die Hämolyse sich ausbilden zu lassen, setzt man die Reagenzgläser während einer bestimmten Zeit, gewöhnlich 1—2 Stunden, in ein Wasserbad oder einen andren Thermostaten von der gewünschten Temperatur (meistens 37° C). Die Hämolyse nimmt mit der Zeit zu und scheint einer Grenze zuzustreben, die um so schneller erreicht wird, je heftiger das Gift ist. Bei 37° C wird sie mit Natronhydrat in etwa 10 Minuten, mit Ammoniak in etwa 40 Minuten und mit Tetanolysin als hämolytischem Agens noch nicht in 200 Minuten erreicht. Nachdem die Röhrchen ihre bestimmte Zeit bei der Versuchstemperatur zugebracht haben, kommen sie auf etwa 24 Stunden in den Eisschrank, wo die unangegriffenen Erythrocyten zu Boden sinken und eine klare blutfarbene Flüssigkeit über sich lassen. Im allgemeinen ist die Farbe um so intensiver, je größer die zugesetzte Giftmenge war. Die Stärke der Hämolyse und die proportionale Farbstärke wird nach den gewöhnlichen kolorimetrischen Methoden gemessen. Es wird vorausgesetzt, daß die Hämolyse unter ähnlichen äußeren Bedingungen nur von der anwesenden Menge freien Lysins und nicht in merklichem Grade von der in der Mischung anwesenden Menge gebundenen Lysins oder Antitoxins abhängt.[1]) Mittels einer Umrechnung, analog der bei der Messung des Diphtherieserums beschriebenen, ist es möglich, nicht nur eine bestimmte Farbstärke zum Vergleich zu benutzen, wie es früher geschah, sondern das ganze Untersuchungsmaterial, soweit die Hämolyse zwischen bestimmten Grenzen bleibt (zwischen vollständiger Hämolyse und einem bestimmten, noch wahrnehmbaren Minimum).

Die Experimente „in vitro" können in ganz bestimmten Zeitintervallen und bei jeder gewünschten Temperatur zwischen 0° und 100° C ausgeführt werden. Ferner steht es uns frei, der zu prüfenden Flüssigkeit große Mengen irgend eines fremden Körpers zuzusetzen, und z. B. unter Verwendung einer physiologischen Rohrzuckerlösung (etwa 7,2%) zur Emulsion den Einfluß verschiedener Salze zu erforschen. Es ist klar, wie viel weiter die Kenntnisse gehen, die wir durch solche Untersuchungen „in vitro" erhalten können, als durch Versuche an lebenden Tieren; außerdem sind die Tierversuche ziemlich kostspielig und können nur in verhältnismäßig kleinem Maßstab von wenigen, mit wohl ausgestatteten Ställen versehenen Instituten durchgeführt werden.

[1]) Es ist auch möglich, daß die Verbindung des Giftes mit dem Antikörper auch eine Giftwirkung, schwächer als das reine Gift, ausübt. Dann muß natürlich diese schwächere Giftwirkung auch mit in Rechnung gezogen werden.

Digitized by Google

Um die Stärke der Agglutinine zu messen, setzt man solange physiologische Salzlösung zu, bis eine bestimmte Menge der Mischung, z. B. 1 ccm, in einer gegebenen Zellemulsion, in gegebener Zeit, bei bestimmter Temperatur, eine bestimmte scharf wahrnehmbare Agglutination nicht mehr hervorbringt. Die Verdünnung des Präparates in dieser Mischung ist ein Maß seines Agglutiningehaltes, soweit dieses die gegebene Zellenart angreift.[1]) Madsen und Jörgensen ziehen vor, die Agglutinine nach der Kraft zu messen, mit der sie eine Bakterienemulsion klären (Festskrift l. c.). Auch bei Präzipitinen wie Lab läßt sich ein Grad der Präzipitation oder Koagulation finden, der sich von höheren und niedrigeren Graden ziemlich scharf abhebt. Durch Neigen der Röhren, die die zu prüfende Lösung enthalten, gewinnen wir eine Vorstellung vom Zähigkeitsgrade des Inhalts, der zuvor während einer gegebenen Zeit einer gegebenen Temperatur ausgesetzt gewesen ist. Ähnlich wie bei Agglutininen kann man die Stärke des präzipitierenden oder koagulierenden Präparates bestimmen.

Die Bakteriolysine sind nicht quantitativ untersucht worden. Ihre Wirkung wurde an Mischungen mit Bazillenemulsionen studiert, die Tieren (z. B. Meerschweinchen) intraperitoneal eingespritzt wurden; nach einiger Zeit wurden Proben herausgenommen und untersucht. Die Beobachtungsmethode erlaubt kaum, ein der quantitativen Behandlung zugängliches Material zu sammeln.

Kapitel 2: Reversibilität der Bindungsvorgänge.

Es war schon die Rede davon, daß viele der Stoffe, mit denen wir in der Serotherapie zu tun haben, ziemlich unbeständig sind. Die Stabilität ist in verschiedenen Fällen sehr verschieden. Manchmal ist das Toxin beständiger als das Antitoxin, z. B. beim Schlangengift, in andren Fällen ist es umgekehrt, z. B. bei Diphtherie- und Tetanusgift. Das Schlangenvenom widersteht, wie Calmette gezeigt hat, einer Temperaturerhöhung auf 68° C, die sein Antitoxin, das Antivenin, in wässriger Lösung, zerstört. Calmette[2]) benutzte diesen Umstand, um das Gift aus einer ungiftigen Mischung mit Antitoxin abzuscheiden; nach der Erhitzung blieb eine giftige Lösung zurück. Nach neueren

[1]) Eisenberg und Volk, Zeitschr. f. Hygiene, 40, 155 (1902). Jörgensen und Madsen, Festskrift l. c.

[2]) Calmette, Ann. de l'inst. Pasteur, 8, 275 (1894). C. r. 134, Nr. 24 (1902).

Digitized by Google

Untersuchungen von Martin und Cherry[1]) gelingt der Versuch nicht, wenn die Mischung länger als 30 Minuten gestanden hat.

Martin und Cherry sprechen als einfachste Erklärung dieses Verhaltens an, daß Schlangengift und Antivenin eine gewisse Zeit brauchen, um miteinander zu reagieren. Wenn man nun die Mischung, ehe sie ihren Endzustand praktisch erreicht hat, 10 Minuten lang auf 68° erwärmt, so wird das freie Antivenin zerstört und die Mischung enthält nachher etwas freies Gift.

Die Versuche Calmettes sind also nicht beweisend für seinen Schluß, daß die Bindung von Schlangenvenom und Antivenin ein reversibler Prozeß ist und daher, sobald das freie Antivenin zerstört ist, seine Verbindung mit dem Gifte sich dissoziiert und neue Mengen Gift und Antivenin bildet. Eine ähnliche Bemerkung läßt sich betreffs der Zersetzung machen, die die unschädliche Mischung eines vom Bacillus pyocyaneus erzeugten Giftes und seines Antitoxins durch Kochen erleidet. Nach dem Kochen ist das Gift, das bei dieser Temperatur beständig ist, in der Lösung zurückgeblieben, während das weniger beständige Antitoxin vernichtet ist, wie Wassermann[2]) gezeigt hat.

Hingegen können derartige Einwände gegen viele andre Versuche, die reversible Prozesse zwischen analogen Substanzen anzeigen, nicht aufrecht erhalten werden. Einer der bemerkenswertesten derartigen Prozesse ist zur Darstellung der sogenannten Immunkörper (Ehrlich nennt sie „Amboceptoren") in Gebrauch. Wenn man eine Aufschwemmung von Erythrocyten eines Ochsen in die Venen eines Kaninchens einspritzt, so enthält das Blut dieses Tieres nach einer gewissen Zeit eine hämolytische Substanz, die Erythrocyten von ähnlicher Art wie die injizierten hämolysiert, d. h. Erythrocyten von Rindern und vielleicht einigen nahe verwanden Tierarten, die ähnliche Erythrocyten besitzen.

Wenn wir Blutserum, das solches Hämolysin enthält, etwa 30 Minuten lang auf 55° (vgl. S. 31) erhitzen, so finden wir, daß es seine hämolytische Kraft verliert. Es ist, wie man sagt, „inaktiviert". Das Hämolysin ist offenbar zersetzt, aber ein Rest ist unversehrt geblieben, wie man durch Zusatz von normalem Meerschweinchenserum zeigen kann. Durch den Zusatz dieser unschädlichen Substanz hat das „inaktivierte" Serum das Vermögen wieder gewonnen, Ochsen-Erythrocyten zu hämolysieren. (Das Meerschweinchenserum hat zwar eine geringe

[1]) Martin und Cherry, Proc. Roy. Soc. 63, 420 (1898).

[2]) Wassermann, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, 22, 263 (1896).

Digitized by Google

hämolytische Wirkung auf fremde Erythrocyten, aber bei diesen Versuchen können so kleine Dosen angewandt werden, daß sie für sich allein keine sichtbare hämolytische Wirkung hervorrufen würden.)

Bordet,[1]) der diese interessanten Erscheinungen entdeckt hat, zeigte, daß das Serum eines Meerschweinchens, das 5—6 mal mit Injektionen von Kaninchen-Erythrocyten (10 ccm defibriniertem Blut) behandelt worden ist, eine agglutinierende und hämolysierende Kraft gegenüber diesen Erythrocyten aufweist. Aus seinen Versuchen schloß er, daß diese Kraft auf der gleichzeitigen Anwesenheit zweier Substanzen beruht, von denen die eine, der „Immunkörper", einer halbstündigen Temperaturerhöhung auf 55° widersteht, während der andre, das „Alexin" (Ehrlichs „Komplement"), bei dieser Temperatur zerstört wird, aber durch normales Serum eines Meerschweinchens oder sogar eines Kaninchens ersetzt werden kann. Bordet sprach die Ansicht aus, daß das „Alexin" als Sensibilisator wirkt und die Erythrocyten empfindlich gegen den „Immunkörper" macht, was sie nach dieser Annahme in natürlichem Zustande nicht wären.

Ehrlich[2]) andrerseits versuchte zu zeigen, daß das Hämolysin eine Verbindung des Immunkörpers mit dem Alexin ist, welche Verbindung partiell dissoziiert ist. Der Immunkörper ist bei höherer Temperatur beständig, das Alexin nicht. Das Alexin kann durch eine ähnliche Substanz ersetzt werden; Alexine sind in vielen normalen Seren enthalten. Wie auf den folgenden Blättern ersichtlich werden wird, wird in der Tat das zugefügte Alexin bei der Bildung des Hämolysins verbraucht und wirkt daher nicht als Sensibilisator, sondern ist chemisch gebunden, wie es Ehrlichs Anschauung verlangt.

Hier haben wir offenbar einen reversiblen chemischen Prozeß vor uns. Ähnliche reversible Prozesse sind bei all den verschiedenen Hämolysinen gefunden worden, die sich bei der Injektion einer Erythrocyten-Emulsion eines Tieres in die Venen eines Tieres von einer andren Art bilden. Ähnlich verhalten sich, nach Ehrlich, die Bakteriolysine, die sich in anologer Weise wie die Hämolysine bilden.

Ein ähnlicher Versuch wurde von Madsen, Famulener und Walbum[3]) mit der unschädlichen Mischung des hämolytischen Agenz, das von Staphylokokken erzeugt wird, des Staphylolysins, und seines Antitoxins angestellt. Hier zeigt die Unschädlichkeit, daß das Hämolysin tatsächlich gebunden ist, denn während der Reaktionsdauer,

[1]) Bordet, Ann. d. l'inst. Pasteur, 12, 692 (1898).

[2]) Ehrlich und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 1 (1899).

[3]) Madsen, Famulener und Walbum, Abh. erscheint demnächst in Oversigt Vidensk. Selsk. Kopenhagen.

Digitized by Google

solange noch Hämolysin frei ist, wird es schnell absorbiert, wenn eine Erythrocyten-Emulsion zugemischt wird, und diese geben danach ihr Hämoglobin ab. Das Staphylolysin verhält sich sehr eigentümlich. Wenn es auf 70° erhitzt wird, verliert es einen großen Teil seiner hämolytischen Kraft, wenn es aber 5 Minuten auf 100° erhitzt wird, kehrt sie merkwürdigerweise wieder. Sein Antitoxin wird beim Sieden zerstört. Durch Erhitzung der unschädlichen Mischung von Staphylolysin und seinem Antitoxin auf 100° während 5 Minuten gewann die Mischung hämolytische Eigenschaften. Die Bindung von Staphylolysin an sein Antitoxin ist also ein reversibler chemischer Prozeß.

Es gibt noch andre Methoden, die eine der Komponenten in einer unschädlichen Mischung eines Toxins und seines Antikörpers zu zerstören. Verschiedene chemische Agenzien vermögen die eine dieser Substanzen schneller als die andre zu zerstören. So wird Ricin von proteolytischem Ferment zwar geschwächt, aber in viel geringerem Grade als sein Antikörper. Diese Eigenschaft ist von Danysz[1]) benutzt worden, um die giftige Wirkung von Ricin wieder herzustellen, das mit so viel Antiricin vermischt war, daß die resultierende Flüssigkeit ungiftig war. Die Flüssigkeit wurde mit einer Lösung des Fermentes gemischt, eine genügend lange Zeit, z. B. 24 Stunden, sich selbst überlassen und verhielt sich dann wie eine Ricinlösung. Hier geht der Prozeß so langsam vor sich, daß das Ricin und Antiricin genügend Zeit gehabt hätten, sich zu verbinden, ehe ihre Zerstörung einen merklichen Grad erreicht hätte.

Es ist möglich, die beiden neutralisierten Substanzen durch weit weniger gewaltsame Mittel zu trennen, nämlich durch Ausschütteln ihrer Lösung mit andern Lösungsmitteln. Madsen und Noguchi[2]) z. B. behandelten eine ungiftige Mischung von Saponin und Cholesterin, die sich so rasch vereinigen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit kaum noch meßbar ist, auf folgende Weise: Die Mischung wurde zur Trockne verdampft, der Rückstand zu Pulver verrieben und mit Chloroform und Äthyläther ausgezogen. Diese Flüssigkeiten besitzen großes Lösungsvermögen für Cholesterin. Der Rückstand des Pulvers wurde in 0,92 prozentiger Chlornatriumlösung gelöst. Die so bereitete Lösung zeigte die Eigenschaften einer Saponinlösung, besonders in Hinsicht auf die hämolytische Wirkung.

Ein andrer Versuch derselben Art wurde von Madsen und

[1]) Danysz, Mélanges des toxines avec les antitoxines, Ann. de l'inst. Pasteur. 16, 311 (1902).

[2]) Madsen und Noguchi, Oversigt Videnskr. Selsk. Kopenhagen 1904, Nr. 6, p. 461.

Digitized by Google

Walbum[1]) ausgeführt. Sie stellten eine Mischung von Ricin und Antiricin her, die nach zweistündiger Erwärmung auf 37° keinen toxischen Effekt zeigte, wenn sie Meerschweinchen eingespritzt wurde. Diese Mischung wurde bei 37° einige Zeit lang mit der gleichen Menge einer 10 prozentigen Emulsion von Kaninchen-Erythrocyten in physiologischer Salzlösung geschüttelt und darauf zentrifugiert. Die Flüssigkeit enthält dann einen Überschuß von Antiricin, was sich durch die abschwächende Wirkung zeigen läßt, die sie auf die agglutinierende Kraft des Ricins gegenüber Erythrocyten ausübt. Andrerseits enthielten die geschüttelten Kaninchen-Erythrocyten einen Überschuß des Nervengifts im Ricin, denn als sie durch Eintragen in reines Wasser hämolysiert wurden, gaben sie eine giftige Lösung, die Meerschweinchen, denen sie eingespritzt wurde, tötete. Hier haben wir zwei verschiedene Gifte, das agglutinierende und das Nervengift, im Ricin, und die entsprechenden zwei Antikörper im Antiricin. Der Versuch zeigt uns, daß diese beiden Gifte an ihre respektiven Antikörper mittels reversibler chemischer Prozesse gebunden sind.

Ein andrer Versuch, der von Wassermann und Bruck[2]) stammt, kann auf ähnliche Weise erklärt werden. Sie injizierten einem Meerschweinchen in das Hinterbein eine ungiftige Mischung, bestehend aus dem Nervengift Tetanospasmin, das zugleich mit dem hämolytischen Tetanolysin vom Bacillus tetani in seiner Bazillenkultur erzeugt wird, und seinem Antitoxin. Das Tier zeigte keine Tetanus-Symptome. Wenn das Tier aber vorher eine lokale Injektion von Adrenalin erhalten hatte, so starb es an Tetanus. Wie H. Meyer und Ransom gezeigt haben, wird das Antitoxin hauptsächlich im Gefäßsystem absorbiert, das Tetanospasmin in den Nerven. Das Adrenalin zieht die Gefäße zusammen und hindert so die Absorption des Antitoxins, hat aber keine Einwirkung auf das Nervensystem, so daß das Spasmin seine vernichtende Wirkung ausüben kann. Der Versuch zeigt daher, daß die ungiftige Mischung freies Toxin enthält, aber wir sind hier nicht ganz sicher, daß das Gift und sein Antidot genügend Zeit hatten, sich zu verbinden.

Die einfachste Art, Toxine und Antitoxine in Mischung voneinander zu trennen, besteht in Diffusion. Sowohl Toxine wie Antitoxine diffundieren in Wasser und in Gelatine, die Toxine aber im allgemeinen viel schneller als die Antitoxine, deren Diffusionsvermögen oft geleugnet wird. Madsen und ich haben diese Erscheinung untersucht.

[1]) Madsen und Walbum, Über Ricin und Antiricin, Cntrlbl. f. Bakteriologie, 36, 253 (1904).

[2]) Wassermann und Bruck, Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 2.

Digitized by Google

Eine 5 prozentige Gelatinelösung wurde in gewöhnliche Reagiergläser etwa 10 cm hoch eingefüllt. Die Lösung erstarrte in einem Eisschrank. Darauf wurde eine Lösung von Toxin oder Antitoxin 1,3 cm hoch auf die Gallertsäule gegossen und das Reagierröhrchen in den Eisschrank zurückgebracht, wo es bei einer Temperatur von etwa + 6° eine Zeit, die sich nach dem Diffusionsvermögen der Substanz richtete, zwischen etwa einer Woche und mehr als einem Monat, belassen wurde. Darauf wurden die flüssige Lösung und die verschiedenen Schichten der Gallertsäule auf ihren Gehalt an der zu untersuchenden Substanz analysiert. Aus diesen Bestimmungen läßt sich die Diffusionskonstante der untersuchten Substanzen berechnen. Wir fanden so folgende Konstanten, gültig für 12° C und ausgedrückt in Tagen und cm:

Natriumchlorid	0,94
Diphtherie-Toxin	0,014
„ -Antitoxin . . .	0,0015
Tetanolysin	0,037
Antitetanolysin	0,0021

Auf die theoretische Bedeutung dieser Zahlen werden wir später zurückkommen. Die Langsamkeit, mit der diese Substanzen im Vergleich zu Chlornatrium diffundieren, hängt offenbar mit ihrem hohen Molekulargewicht zusammen. Dieses ist wahrscheinlich von derselben Größenordnung, wie das von E. W. Reid[1]) für Hämoglobin gefundene, nämlich 48 000. Das der Antitoxine mag noch 10—100 mal höher sein.

Da die Antitoxine etwa 10 mal langsamer als die Toxine diffundieren, erscheint es theoretisch möglich, sie durch Diffusion zu trennen. Der erste Versuch in dieser Richtung wurde von Martin und Cherry[2]) angestellt. Sie bereiteten 60 cc einer ungiftigen Mischung aus Diphtherietoxin — enthaltend 500 letale Dosen — und seinem Antitoxin, und erwärmten sie zwei Stunden lang auf 30°. Diese Mischung wurde unter 50 Atmosphären Druck durch eine Gelatineschicht, die in ein Pasteur-Chamberland-Filter eingelagert war, durchfiltriert. Das Filtrat enthielt hauptsächlich Wasser, das viel schneller durch das Filter geht, als das Toxin oder Antitoxin. Das Filtrat wurde geprüft und gefunden, daß es im ccm weniger als 3 und 5% resp. des Giftes enthielt, das in einem ccm der ursprünglichen Lösung vorhanden war, wenn das Gift als vollkommen frei angenommen wurde. Nun dringt Wasser schneller als Chlornatrium

[1]) E. W. Reid, Journ. of Physiology, **33**, 13 (1905). Das Molekulargewicht wurde aus dem osmotischen Druck einer 1 prozentigen Lösung berechnet, der bei 15° zu 3,85 mm gefunden wurde.

[2]) Martin und Cherry, Proc. Roy. Soc. **63**, 420 (1898).

Digitized by Google

durch Gelatine und Chlornatrium etwa 67 mal schneller als Diphtherietoxin. Daher können wir erwarten, daß selbst, wenn gar kein Gift gebunden wäre, das erste Filtrat im ccm nur 1,5% der Giftmenge in der ursprünglichen Mischung enthalten müßte. Später, wenn die ursprüngliche Mischung sich durch Wasserverlust konzentriert hat, wie es bei diesem Versuch der Fall gewesen zu sein scheint, kann ein höherer Prozentsatz erwartet werden. Aber der Schluß, der daraus gezogen worden ist, daß höchstens 5% des Toxins tatsächlich frei sind, kann nicht als durch die Tatsachen bewiesen betrachtet werden.

Einen ähnlichen Versuch machte Craw[1]) im Lister-Institut mit Mischungen eines Lysins aus Bacillus megatherium und seines Antitoxins. Er fand, daß aus ungiftigen Gemischen sich das Gift in der Gelatinehaut konzentriert, während der Rest der Flüssigkeit antitoxische Eigenschaften zeigt. Er schließt daher, daß die Bindung dieses Giftes an seinen Antikörper einem „teilweise reversiblen" Prozeß zuzuschreiben ist. Dieser Beweis scheint umsomehr überzeugend, als Craw offenbar mit theoretischen Voraussetzungen gearbeitet hat, die ihn dazu führten, nach einem Beweis gegen die Reversibilität des Prozesses zu suchen.

Der Versuch gelang in gleicher Weise, auch wenn ein großer Überschuß von Antilysin, die ein- bis dreifache Menge des „neutralisierenden" Quantums, zugesetzt war. Craw hatte die Vorsicht gebraucht, diese Mischungen drei Stunden lang auf 37° zu erwärmen und dann eine Stunde lang bei 10° stehen zu lassen, so daß kein Grund vorliegt, zu glauben, daß die Reaktion, die wahrscheinlich der des Tetanolysins sehr ähnelt, noch nicht praktisch zu Ende gegangen wäre. Im Filtrat fand Craw keine Spur des Giftes, wenn er mit „neutralen" oder „überneutralen" Lösungen arbeitete.

Wir wollen einen Augenblick die Ideen betrachten, die Craw zu der Annahme führten, daß der Bindungsprozeß zwischen Toxin und Antitoxin nicht reversibel sei. Die Toxine und besonders die Antitoxine gelten für Kolloïde. Craw nimmt daher an, daß die sogenannten Lösungen der Toxine, der Antitoxine und der Reaktionsprodukte von beiden in Wirklichkeit feine Suspensionen sind. Für diese Behauptung wird kein Grund angegeben, aber es scheint, als ob Craw die Unfähigkeit zur Diffusion als ein Kennzeichen der Suspensionen angesehen hätte, und das kann als richtig zugegeben werden. Aber wenn Craw annimmt, daß Antitoxine nicht diffundieren, so scheint er die Resultate von Madsens und meiner Untersuchung über diesen Punkt nicht zu

[1]) J. A. Craw, Proc. Roy. Soc. 76, 179 (1905).

Digitized by Google

kennen. Vielmehr scheint er unhaltbare Schlüsse aus Brodies[1]) Versuchen zu ziehen, die zeigten, daß Diphtherie-Antitoxin durch ein Gelatinefilter in ganz kurzer Zeit nicht in merklicher Menge geht. Wir können daher die theoretischen Überlegungen von Craw beiseite lassen, von denen er überdies selbst sagt, daß sie auf einige seiner Versuche nicht anwendbar sind.

Andre sagen mit Nernst,[2]) die van't Hoffschen Gesetze seien auf Kolloide nicht anwendbar, also auch nicht auf Toxine und Antitoxine. Nernst hat selbst gezeigt, daß die Diffusion vom osmotischen Druck herrührt und ihm proportional ist. Da nun Toxine und Antitoxine wie andre bekannte Substanzen diffundieren, können wir schließen, daß sie van't Hoffs Gesetze des osmotischen Druckes erfüllen. Bei Madsens und meinen Versuchen zeigte sich die Verteilung dieser Substanzen in den verschiedenen Schichten der Gallerte genau so, wie diese Gesetze es verlangen. Und wenn van't Hoffs Gesetz sich für den osmotischen Druck dieser Stoffe als gültig erweist, dann müssen auch die Gesetze der chemischen Massenwirkung (Guldberg und Waage) für ihre Reaktionen gelten. Und selbst wenn wir nicht wüßten, daß diese Substanzen sich in dieser Hinsicht wie andre, bekannte, verhalten, wären wir berechtigt, mit dieser vollkommen natürlichen Hypothese zu arbeiten, bis mit großer Sorgfalt bewiesen wäre, daß sie falsch ist. Sonst würden wir in ganz andrer Weise vorgehen, als wie es in andren Teilen der Wissenschaft üblich ist.

In letzter Zeit ist viel Diskussion über diese Frage geführt worden. Als Madsen und ich zum erstenmal die Einwirkung von Tetanolysin und Antilysin aufeinander unter der Voraussetzung, daß sie einem reversiblen Prozeß zuzuschreiben wäre, berechneten, da wußten wir sehr wohl, daß das Tetanolysin gleichzeitig einer andern Reaktion unterlag, die es langsam zerstörte. Aber darin lag kein Grund, die bekannten Gesetze der reversiblen Prozesse nicht anzuwenden. Wir überzeugten uns nur, daß der Einfluß dieses sekundären Vorgangs bei unsrer Versuchsmethode vernachlässigt werden konnte. Wäre das nicht der Fall gewesen, so wäre eine Korrektion für den störenden Effekt angebracht worden. Neuerdings hat Sachs[3]) gezeigt, daß noch eine andre Reaktion, als die von Madsen und mir untersuchte, zwischen Tetanolysin und seinem Antitoxin stattfindet, die bis zu

[1]) T. G. Brodie, Journ. of Pathology and Bacteriology 1896—97, 460—464.

[2]) Nernst, Über die Anwendbarkeit der Gesetze des chemischen Gleichgewichts, Zeitschr. f. Elektrochemie, 10, Nr. 22 (1904).

[3]) H. Sachs, Über die Konstitution des Tetanolysins, Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 16.

Digitized by Google

einem gewissen Grade die von uns studierte Hauptreaktion beeinflussen kann. Die einfachen Beziehungen, die wir gefunden haben, scheinen zu zeigen, daß auch die Störungen durch den neuen Vorgang innerhalb solcher Grenzen bleiben, daß sie bei gewöhnlichen Versuchen über die Neutralisation des Tetanolysins vernachlässigt werden können. Wir werden später auf diese Frage zurückkommen.

Die Unvollständigkeit des chemischen Bindungsvorganges zwischen Toxinen und Antitoxinen hat dazu beigetragen, den Gedanken zurückzudrängen, daß wirkliche chemische Verbindungen von diesen Stoffen gebildet werden. Denn die einzigen chemischen Reaktionen, mit denen die Forscher vertraut waren, die die Neutralisation der Toxine studierten, waren die vollständigen Reaktionen. Behring,[1]) der auf diesem Feld der erste war, sprach die Ansicht aus, daß Toxin von Antitoxin zerstört wird, ohne daß die Menge letzterer Substanz sich vermindert. Diese Vorstellung war mit Ehrlichs Messungen an Diphtheriegift unvereinbar, nach denen die doppelte Antitoxinmenge die doppelte Giftmenge neutralisiert. Ehrlich kam deshalb zu der Überzeugung, daß eine wirkliche chemische Reaktion stattfindet. Andrerseits nahmen Buchner[2]) und Roux[3]) an, daß die Wirkung von Antitoxin auf Toxin nur im empfindlichen Tier stattfindet. Nach ihrer Ansicht wirkt das Antitoxin in Wirklichkeit auf das Tier, das es zum Kampfe gegen das Gift stimuliert. Die Vorstellung wurde durch solche Versuche gestützt, wie der von Calmette, nach dem Toxin und Antitoxin in ihren Mischungen koëxistieren. Gegen diese Erklärungsart setzte Ehrlich seine Versuche über die Neutralisation von Toxinen „in vitro", außerhalb des lebenden Tieres, und Martin und Cherry zeigten, daß Resultate wie die Calmettes von ungenügender Reaktionszeit herrühren können. Die Versuche in vitro sind nach allen Seiten vervielfältigt worden und der Einfluß der Reaktionszeit ist in den meisten untersuchten Fällen beobachtet worden, so daß die Vorstellung einer chemischen Bindung zwischen Toxinen und Antitoxinen allgemein angenommen worden ist. Aber unvollkommene Kenntnis der begrenzten chemischen Reaktionen hat Ehrlich und andre, die diese Erscheinungen erforschten, zu der Annahme gebracht, daß die beobachteten Vorgänge immer unbegrenzt sind, und so waren sie nicht imstande, alle die Erscheinungen zu erklären, die die Existenz eines chemischen Gleichgewichts zwischen den untersuchten Substanzen anzeigen. Zur Erklärung einiger dieser Er-

[1]) Behring und Kitasato, Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 49.
[2]) Buchner, Münch. med. Wochenschr. 1893, 480.
[3]) Roux und Vailland, Ann. de l'inst. Pasteur 8, 724 (1894).

Digitized by Google

scheinungen erdachten Ehrlich und seine Schule die ziemlich künstliche Hypothese, daß die Gifte in Wirklichkeit aus einer Mischung von vielen verschiedenen, giftigen und unschädlichen Substanzen bestehen, die sich mit dem Antitoxin verbinden. Das am gründlichsten untersuchte Gift, das Diphtheriegift, enthält nach Ehrlich nicht weniger als acht solche verschiedenen Substanzen. Fast jede neue Erscheinung veranlaßte ihn und seine Schule, die Gegenwart einer neuen Substanz anzunehmen. Dadurch hat die Theorie Ehrlichs einen großen Teil ihres Kredits verloren.

Auch der Einfluß der Reaktionszeit ist von Ehrlich nicht so gewürdigt worden, wie es notwendig ist. So hatten z. B. Madsen und Dreyer[1]) gezeigt, daß ein Gemisch von Diphtheriegift und -Antitoxin, das bei subkutaner Injektion in Meerschweinchen unschädlich ist, Kaninchen bei intravenöser Injektion tötet. Diese Erscheinung erklärte Ehrlich[2]) durch die Anwesenheit einer Substanz, die wohl Kaninchen, aber nicht Meerschweinchen töten kann, im Diphtheriegift. Die Untersuchungen von Morgenroth[3]) zeigen, daß der ganze Unterschied der verschiedenen Injektionsweise zuzuschreiben ist. Denn ein Gemisch, das bei subkutaner Injektion für Meerschweinchen unschädlich ist, kann sie töten, wenn es interkardial, d. h. direkt ins Herz injiziert wird. Von der Reaktion zwischen Diphtherie-Toxin und -Antitoxin nahm Ehrlich nach seinen subkutanen Injektionen bei Meerschweinchen an, daß sie schon vor Ablauf einer Viertelstunde beendigt ist; aber nach Morgenroths Versuchen braucht diese Reaktion bei 20° mehrere Stunden, um das Gleichgewicht zu erreichen. Die Versuche, die bei Kaninchen und Meerschweinchen verschiedene Resultate gaben, wurden mit beinahe frischen Mischungen aus Gift und Antikörper gemacht. Wenn solch eine Mischung subkutan injiziert wird, so diffundiert sie sehr langsam, während mehrerer Stunden, ins Blut, und gleichzeitig bindet das Antitoxin das Toxin. Man braucht nicht, wie Morgenroth, eine neue Hypothese einzuführen, nämlich, daß die Gewebe des Meerschweinchens ein auf das Gift einwirkendes katalytisches Agens enthalten. Die verhältnismäßig hohe Temperatur (37°) des Tieres erklärt die verhältnismäßig große Reaktionsgeschwindigkeit. Wenn dagegen die Mischung in die Venen eingespritzt wird, so wird das Gift von den Geweben des Tieres gebunden, ehe es Zeit gehabt hat, mit dem Antitoxin zu reagieren.

Einige andre in der Serotherapie geläufige Prozesse zeichnen

[1]) Dreyer und Madsen, Zeitschr. f. Hygiene **37**, 250 (1901).
[2]) Ehrlich, Berl. klin. Wochenschrift 1903, Nr. 35—37.
[3]) Morgenroth, Zeitschr. f. Hygiene, **48**, 177 (1904).

Digitized by Google

sich durch hohe Reaktionsgeschwindigkeit aus. So reagieren Agglutinine mit Bakterien in weniger als fünf Minuten, selbst bei 0°, nach den Versuchen von Eisenberg und Volk.[1]) (Kürzere Reaktionszeiten wurden nicht geprüft.) Auch hier beobachten wir einen reversiblen Prozeß. Denn das von den Bakterien oder Erythrocyten absorbierte Agglutinin kann mittels einer physiologischen Salzlösung wieder ausgewaschen werden, wie Landsteiner und Eisenberg und Volk zeigten. Bordet nahm an, daß diese Reaktion von derselben Art ist, wie die Adsorption eines Farbstoffes an einer Faser. Aber das Adsorptionsphänomen ist ein sehr langsames, das Färben der Fasern dauert bei 100° etwa 30 Minuten und bei gewöhnlicher Zimmertemperatur (17° C) über 2 Tage. Die Theorie von Bordet hat also wenig Wahrscheinlichkeit für sich. Ich bin zu dem Ergebnis geführt worden, daß es sich hier um einen Absorptionsprozeß handelt. Wenn wir uns vorstellen, daß Bakterien, oder andre Zellen von 5 bis 10 μ Durchmesser mit der Lösung einer Substanz, die leicht in die Zellen eindringt, geschüttelt werden, so erkennen wir, daß der Diffusionsprozeß in weniger als 5 Minuten sein Gleichgewicht erreichen kann, selbst wenn die Diffusionskonstante der Substanz 0,001 ist, so klein wie die der am schwersten diffundierenden Antitoxine.

Zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit führen einige Versuche von Madsen und Walbum. Sie schichteten in einem Reagenzglas vorsichtig 100 ccm einer Erythrocytenemulsion und eine kleine Menge Tetanolysinlösung übereinander, so daß die Lösung nur in die obersten Schichten der Emulsion gelangte, und schüttelten nach Verlauf von 30 Sekunden das Glas um. Bei einem zweiten Versuch gossen sie die Emulsion in kräftigem Strome in die giftige Lösung, so daß die Mischung sofort vor sich ging. Die Hämolyse war beim zweiten Versuch fast doppelt so groß, wie beim ersten. Die Erklärung liegt in der Tatsache, daß die Löslichkeit des Tetanolysins in den Erythrocyten viel größer als in der umgebenden Lösung ist. Während der kurzen Zeit von 30 Sekunden hatten die obersten Erythrocyten nahezu 30% des Gifts absorbiert, so daß nur etwa 70% für die Absorption in der Hauptmenge der Erythrocyten übrig geblieben waren. Infolge des großen Absorptionskoeffizienten hielten die Erythrocyten fast die ganze Giftmenge, die sie sich angeeignet hatten, beim Schütteln zurück, und die schließliche Hämolyse war etwa so groß, als wenn nur 70% der beim ersten Versuche angewandten

[1]) Eisenberg und Volk, Zeitschr. f. Hygiene, **40**, 155 (1902).

Digitized by Google

Giftmenge zugesetzt und gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt worden wären.

Ebenso scheinen sich andre Substanzen zu verhalten, die von Erythrocyten oder andren Zellen absorbiert werden. Zu dieser Kategorie gehören die Immunkörper sowie ihre Verbindungen mit Alexinen, die sich, wie später gezeigt werden soll, bezüglich ihrer Absorption fast ebenso wie Agglutinine verhalten. Bordet[1]) zeigte, daß eine gegebene Menge Erythrocyten von einer bestimmten Menge Bluthämolysin stärker hämolysiert wird, wenn sie auf einmal zugesetzt werden, als wenn sie nacheinander in zwei Portionen zugesetzt werden.

Daß auch hier der Vorgang ein reversibler ist, zeigt sich in einem Versuch von Morgenroth.[2]) Er setzte Erythrocyten, die einen Immunkörper absorbiert hatten, zu andren, nicht vorbehandelten Erythrocyten, und mischte die Emulsion davon mit Alexin. Dann wurden nicht nur die ursprünglich behandelten Erythrocyten, sondern auch die andren hämolysiert, was zeigt, daß ein Teil des Immunkörpers die behandelten Erythrocyten verlassen hatte und durch die umgebende Flüssigkeit in die nichtbehandelten diffundiert war. Der Versuch gelang nicht, wenn dem Diffusionsprozeß nicht eine genügende Zeit, etwa eine Stunde, gelassen wurde, ehe das Alexin zugesetzt wurde.

Ähnliche Versuche mit analogen Resultaten wurden von Joos[3]) mit Typhusbazillen und ihrem Agglutinin ausgeführt.

Ganz kürzlich hat Morgenroth[4]) einige Versuche mit Kobralysin gemacht, die sehr zwingend beweisen, daß dieses Gift von seinem Antitoxin nicht zerstört, sondern nur gebunden wird. Er setzte so viel Antitoxin zu dem Kobragift, daß seine Wirkung vollkommen neutralisiert war, und darauf einen kleinen Überschuß. Nach 7 Tagen gab er zu 5 ccm der Mischung 0,25 ccm normale Chlorwasserstoffsäure, die bewirkt, daß die Bindung zwischen Toxin und Antitoxin sich löst. Das wurde so bewiesen, daß die saure Mischung 30 Minuten lang auf 100° erwärmt wurde, wodurch das Antitoxin zerstört wurde, während das Gift selbst nicht merklich verändert wurde. Das konnte durch Neutralisation der Lösung gezeigt werden, nachdem sie sich auf Zimmertemperatur abgekühlt hatte. Die Toxizität dieser Lösung war fast dieselbe, wie die der ursprünglichen Lösung ohne

[1]) Bordet, Ann. de l'institut Pasteur, 14, Nr. 5 (1900).

[2]) Morgenroth, Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 2.

[3]) Joos, Z. f. Hygiene, 40, 203 (1902). vgl. Eisenberg, Ctrbl. f. Bakteriologie, 34, 261 u. 268 (1903).

[4]) Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 50.

Digitized by Google

Antitoxin. Hier liegt die Eigentümlichkeit vor, auf die Sachs zuerst aufmerksam gemacht hat, daß die Gegenwart von Säure — wahrscheinlich durch Bindung — das Gift vor der Zerstörung durch die Hitze schützt.

Morgenroth kritisiert eine von Nernst[1]) skizzierte und von Biltz, Much und Siebert[2]) ausgearbeitete Theorie, nach der die Toxine an das „kolloidale" Antitoxin „adsorbiert" und dann zerstört werden. Morgenroth sagt mit Recht, daß diese Theorie, „die bis jetzt jeder experimentellen Grundlage entbehrt", durch seine Versuche vollständig widerlegt ist.

Wie in der Folge gezeigt werden wird, ändert sich die Reaktionsgeschwindigkeit der verschiedenen Toxine mit der Temperatur nach einem Gesetz, das aus thermodynamischen Überlegungen abgeleitet worden ist, wobei die Gültigkeit des van't Hoffschen Gesetzes für die betreffenden Lösungen vorausgesetzt werden muß. Die Anwendbarkeit dieses Gesetzes auf die Reaktionsgeschwindigkeiten der Toxine kann deshalb als ein neuer Beweis dafür gelten, daß die allgemeinen Gesetze, die für das Verhalten gewöhnlicher Materie gefunden sind, auch bei den Prozessen gültig sind, die zwischen den Stoffen vor sich gehen, mit denen sich die Immunitätslehre beschäftigt. Kein einziger Beweis gegen die Gültigkeit dieser Gesetze hat beigebracht werden können, und es scheint mir sehr unphilosophisch zu sein, a priori vorauszusetzen, daß andre Gesetze die Reaktionen der Toxine und Antitoxine regeln müssen, als die das Verhalten andrer Stoffe beherrschen.

Kapitel 3: Reaktionsgeschwindigkeiten. Homogene Systeme.

Wir haben schon eine Reaktionsgeschwindigkeit von der einfachsten Art behandelt, nämlich den spontanen Zerfall verschiedener Antikörper in den Venen der Tiere (vgl. S. 3). Wenn jedes Molekül eines Stoffes unabhängig von allen andren Molekülen zerfällt, was der allgemeine Fall in der Chemie zu sein scheint, dann ist die Zahl der in einem kurzen Zeitintervall zerfallenden Moleküle einfach proportional der Zahl der in dieser Zeit anwesenden Moleküle. Wenn diese Zahl in einer bestimmten Zeit, die als Beginn des Prozesses betrachtet werden kann, A genannt wird, und die Zahl der zu einer

[1]) Nernst, Zeitschr. f. Elektrochemie, 10, Nr. 22 (1904).
[2]) Biltz, Much und Siebert, Behrings Beiträge 1905.

Digitized by Google

gegebenen Zeit t zersetzten Moleküle x genannt wird, dann ist $\frac{dx}{dt}$ die Verminderungsgeschwindigkeit der aktiven Moleküle, und wir erhalten die bekannten Gleichungen:

$$\frac{dx}{dt} = k\,(A - x)$$

und

$$\log \frac{A - x_0}{A - x_1} = \frac{k}{2{,}303}\,(t_1 - t_0) = \varkappa\,(t_1 - t_0)$$

wo sich t_1 und x_1 und t_0 und x_0 entsprechen.[1]) Zersetzungen, die nach diesen Formeln verlaufen, sind in der Chemie viele bekannt, z. B. der Zerfall des Arsenwasserstoffs, AsH_3, und werden „monomolekulare Reaktionen" genannt.

Vielfach wird die Zersetzung durch fremde Moleküle hervorgerufen. So reagiert z. B. Monochloressigsäure mit Wasser unter Bildung von Glykolsäure und Chlorwasserstoff, eine sogenannte bimolekulare Reaktion. Wenn die Anfangskonzentration der zweiten reagierenden Molekülart gleich B ist, erhalten wir:

$$\frac{dx}{dt} = \varkappa_1\,(A - x)\,(B - x).$$

Wenn B sehr groß gegen x und A ist, so gibt diese Gleichung dieselbe Lösung wie die Differentialgleichung für die monomolekulare Reaktion, wenn wir $\varkappa_1 = \varkappa\, B$ setzen.

In vielen Fällen, z. B. bei der Inversion des Rohrzuckers, bildet sich durch einen sekundären Prozeß das eine reagierende Molekül — hier das Wasserstoffion — so schnell zurück, daß seine Konzentration als unabhängig vom Fortschritt der Reaktion angesehen werden kann. In diesen Fällen, die zu den sogenannten „katalytischen" Prozessen gehören, können wir auch die Gleichung der monomolekularen Reaktion anwenden, indem wir $\varkappa$ proportional der Konzentration der unveränderten Moleküle setzen (hier der H-Ionen).

Wenn $A = B$, so gibt die Differentialgleichung der bimolekularen Reaktion die Lösung:

$$\frac{1}{A - x_1} - \frac{1}{A - x_0} = \varkappa\,(t_1 - t_0).$$

Als besonderer Fall kann betrachtet werden, daß zwei Moleküle derselben Art miteinander reagieren.

---

[1]) Der Faktor $\frac{1}{2{,}303}$ rührt von dem Übergang von natürlichen auf dekadische Logarithmen her.

Digitized by Google

Wenn n Moleküle, alle in gleicher Konzentration, miteinander reagieren — die sogenannte „n-molekulare Reaktion" — so finden wir:

$$\frac{dx}{dt} = \varkappa (A - x)^n$$

was die Lösung gibt:

$$\left(\frac{1}{A - x_1}\right)^{n-1} - \left(\frac{1}{A - x_0}\right)^{n-1} = \varkappa (t_1 - t_0).$$

Diese Gleichung wurde von Madsen auf den freiwilligen Zerfall von Antikörpern angewendet. n ist keine ganze Zahl, und die Gleichung kann hier als eine rein empirische Regel angesehen werden.

Sehr regelmäßige Resultate, die einer monomolekularen Reaktion entsprachen, ergaben sich bei einer Untersuchung von Madsen und Famulener. Sie verfolgten die Abschwächung von Vibriolysin bei 48 ° C. Die hämolytische Kraft p einer Vibriolysinlösung, die sich in einem Thermostaten befand, wurde nach verschiedenen Zeiten t geprüft. Die Kraft ist umgekehrt proportional der Menge Lösung, die gebraucht wird, um eine bestimmte Wirkung hervorzurufen, z. B. 10 prozentige Hämolyse in 8 cc einer 2,5 prozentigen Erythrocyten-Emulsion nach einer Stunde bei 37 °. Die Reaktion folgt unverkennbar den Gesetzen der monomolekularen Reaktionen, nach der Gleichung:

$$-\frac{dp}{dt} = \varkappa p,$$

mit Hilfe deren die berechneten Werte $p_{ber.}$ abgeleitet sind, die mit den beobachteten $p_{beob.}$ zu vergleichen sind. Die Temperatur war 46,4 °. $\varkappa = 0{,}0079$.

Zeit (t) in Minuten	$p_{beob.}$	$p_{ber.}$	Zeit (t) in Minuten	$p_{beob.}$	$p_{ber.}$
0	100	100	50	40,8	40,4
10	78,3	83,2	60	34,4	33,6
20	67,6	69,5	70	25,1	28,1
30	59,3	57,9	80	23,0	23,3
40	49,8	48,3			

Die Übereinstimmung zwischen den beobachteten und berechneten Werten ist sehr befriedigend, und es bleibt kein Zweifel, daß das Gesetz tatsächlich erfüllt ist, das durch die oben abgeleitete Differentialgleichung dargestellt wird.

Der Einfluß der Temperatur auf den spontanen Zerfall des Vibriolysins ist sehr groß, wie die folgende Tabelle zeigt, die einer noch nicht veröffentlichten Arbeit von Madsen und Famulener entnommen ist.

Digitized by Google

Geschwindigkeit $\varkappa$ des Zerfalls von Vibriolysin bei verschiedenen Temperaturen:

Temp.	$\varkappa$ beob.	$\varkappa$ ber.	Temp.	$\varkappa$ beob.	$\varkappa$ ber.
49,975	0,0778	0,0741	46,4	0,0079	0,0081
49,75	0,066	0,066	45,97	0,0063	0,0062
49,00	0,039	0,041	45,65	0,0057	0,0051
48,15	0,023	0,024	45,145	0,0036	0,0036
47,35	0,0134	0,0128			

Die berechneten Werte sind mit Hilfe der Formel gefunden:

$$V_1 = V_0 e^{\frac{\mu}{2}\left(\frac{T_1 - T_0}{T_0 T_1}\right)}$$

die sich, als mit der Erfahrung übereinstimmend, in andren Teilen der physikalischen Chemie für Reaktionsgeschwindigkeiten bewährt hat. μ ist 128 000 oder etwa fünfmal so groß, wie bei der Rohrzuckerinversion (25 600). Die Reaktionsgeschwindigkeit wächst im Verhältnis 10 zu 1 in einem Intervall von 3,8 Graden.

Ganz ähnlich wie Vibriolysin verhält sich Tetanolysin, wie aus folgender, einer bald erscheinenden Arbeit von Madsen und Famulener entlehnten Tabelle hervorgeht.

Zerfall von Tetanolysin bei 53,5° und 49,8°.

t (Min.)	p beob.	p ber.	t (Min.)	p beob.	p ber.
0	100	100	0	100	100
2	70,9	69,5	20	80,0	80,6
4	43,5	48,6	40	61,1	64,8
6	27,1	33,6	60	52,1	52,3
8	20,4	23,3	80	46,3	42,1
10	14,9	16,2	120	26,8	26,7
12	11,4	11,2	180	14,6	14,3
	$\varkappa_1 = 0{,}079.$			$\varkappa_0 = 0{,}0047.$	

Hier ist der Einfluß der Temperatur noch größer als bei der Zersetzung des Vibriolysins, μ ist etwa 162 000. Die Reaktionsgeschwindigkeit zeigt auch hier einen monomolekularen Prozeß an.

Der Zerfall der Lysine, und allgemein der Substanzen, mit denen sich die Serotherapie beschäftigt, wird durch Zusatz von Säuren oder Basen zu ihren Lösungen sehr stark befördert. Madsen und Famulener haben z. B. die Zerfallgeschwindigkeit einer Vibriolysinlösung untersucht, die so viel Natronhydrat enthielt, daß ihre Alkalität 0,005 n war.

Digitized by Google

Zerfall von Vibriolysin in Gegenwart von 0,005 n Natronhydrat bei 48° und 46,5°.

t (Min.)	q beob.	q ber.	t (Min.)	q beob.	q ber.
0	100	100	0	100	100
2,5	83	82,6	15	51,7	48,6
5	69,4	69,8	30	32,2	23,2
7,5	60,1	58,4	45	21,2	21,2
10	50	48,8	60	14,1	14,1
12,5	36,5	40,3	75	8,6	9,3
15	32,2	34,2	90	6,2	6,1
17,5	28,2	28,5	105	4,4	4,1

Die Reaktionskonstanten dieses monomolekularen Vorgangs ergeben sich zu 0,6313 bei 48° und 0,012 bei 46,5°. Daraus folgt ein Wert von $\mu = 128\,000$, also genau derselbe wie bei Vibriolysin ohne Alkalizusatz. Diese Übereinstimmung verdient vielleicht nicht soviel Interesse, wie man zuerst glauben möchte, denn die Vibriolysinlösung ist an und für sich etwas alkalisch. Aber es ist nicht wahrscheinlich, daß ihre Alkalität von Natronhydrat herrührt, sondern hauptsächlich von schwächeren organischen Basen, und deshalb ist die Koinzidenz der beiden μ doch bemerkenswert.

Auch andre Substanzen üben einen Einfluß auf die Zerstörung des Vibriolysins und Tetanolysins aus, wenn auch in weit geringerem Grade als Alkalilösungen. Dazu gehört Ammoniak, dessen Einfluß kleiner als der von Natronhydrat ist, aber der Unterschied ist bei weitem nicht so ausgesprochen, daß man an eine Wirkung der OH-Ionen denken könnte. Z. B. wächst die Reaktionskonstante von Vibriolysin, die bei 46,2° den Wert 0,0066 (per Minute) besitzt, auf 0,081, wenn 3,4 ccm normal NaOH in 100 ccm der Flüssigkeit zugegen sind, und auf etwa 0,075 bei Gegenwart der äquivalenten Menge Ammoniak. Zusatz von Salzsäure gab je nach der angewandten Menge verschiedene Resultate. Der erste Zusatz drückte die Reaktionskonstante herunter, und sie erreicht ein Minimum von 0,00052 bei Gegenwart von 4,25 ccm normal HCl in 100 ccm der Flüssigkeit. Höhere Beträge lassen die Reaktionskonstante wieder wachsen, ihr Wert beträgt 0,022 bei Gegenwart von 6 ccm, und 0,109 bei Gegenwart von 6,75 ccm normal HCl in 100 ccm der Flüssigkeit. Daraus scheint hervorzugehen, daß der erste Säurezusatz etwas in der ursprünglichen Kultur enthaltenes Alkali neutralisierte, die weiteren Zusätze dann ihre zerstörende Wirkung ausübten. Der geringe Unterschied zwischen der Wirkung von Ätznatron und Ammoniak führt auf den Schluß, daß die Wirkung der Basen darin besteht, daß sie eine alkalische Substanz in der Bakterienkultur frei machen. Die

Digitized by Google

geringere Wirkung des Ammoniaks kann aus seiner Schwäche erklärt werden, der zufolge Gleichgewicht mit der Base aus der Kultur erreicht wird, ehe sie ganz in Freiheit gesetzt ist.

Auch die Gegenwart schwacher Säuren, z. B. Essigsäure, beschleunigt die Zerstörung des Vibriolysins. So geben 9 ccm normal CH_3COOH in 100 ccm Kultur eine Reaktionskonstante von 0,064, ihre Wirkung ist nahezu gleich der von 6,5 ccm normal HCl. Die schwache Säure übt einen kleineren Einfluß aus als die starke, was erwartet werden konnte, da die neutralisierte Base schwächer als Ammoniak ist und eine merkliche Hydrolyse eintreten muß.

Die Reaktionskonstante ist der Menge zugesetzter Base innerhalb der großen Versuchsfehler praktisch proportional, sobald die Alkalität 0,01 n überschreitet; aber für die Wirkung der Säuren ist keine solche Regelmäßigkeit gefunden worden, selbst wenn wir vom Neutralisationspunkt ausgehen, der nahe mit dem Punkt der minimalen Reaktionskonstante zusammenfällt.

Der Alkaligehalt der natürlichen Vibriolysinlösung erklärt eine andre von Madsen gefundene Tatsache, daß nämlich die Reaktionskonstante von der Anfangskonzentration abhängt und ihr nahezu proportional ist. Wirklich ist die Bouillon, in der die Vibrionen wachsen, schwach alkalisch. Madsen fand, daß bei 47,8° die ursprüngliche Vibriolysinlösung $\varkappa_1 = 0{,}0198$ gab, dieselbe Lösung, auf die Konzentrationen 0,5 und 0,25 gebracht, gab $\varkappa_2 = 0{,}0072$ und $\varkappa_4 = 0{,}0039$. Diese drei Zahlen stehen nahezu im Verhältnis 4:2:1 zueinander, wie die entsprechenden Konzentrationen, was leicht zu verstehen ist, wenn das anwesende Alkali einen katalytischen Einfluß ausübt.

Ebenso verwickelt ist der Einfluß, den Säure- und Basezusatz auf die Abschwächung des Tetanolysins ausüben, das gleichfalls an und für sich alkalisch ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit $\varkappa$ wächst mit der zugesetzten Alkalimenge; bei Säurezusatz nimmt sie erst ab, geht durch ein sehr flaches Minimum und steigt wieder bei weiterem Säurezusatz. Zur Erläuterung seien die folgenden Zahlen (gültig bei 49,83°) angeführt:

98	ccm	Tetanolysinlösung	+ 2	ccm	norm. NaOH	$\varkappa = 0{,}0112$
99	„	„	+ 1	„	„ „	$\varkappa = 0{,}0097$
99,5	„	„	+ 0,5	„	„ „	$\varkappa = 0{,}0086$
100	„	„	—	„	„ „	$\varkappa = 0{,}0047$
99	„	„	+ 1	„	„ H_2SO_4	$\varkappa = 0{,}0071$
98	„	„	+ 2	„	„ „	$\varkappa = 0{,}0435$

Daraus scheint hervorzugehen, daß der erste Säurezusatz von einer schwachen Base in der Nährlösung gebunden wird, und daß die

Digitized by Google

ersten Alkalispuren gleichfalls gebunden werden, wahrscheinlich indem sie eine schwache Base in der Bouillon frei machen.

Die Zahlen für die Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von 2 ccm norm. H_2SO_4 in 100 ccm sind die folgenden, die einen monomolekularen Prozeß anzeigen:

t (Min.)	Stärke beob.	Stärke ber.
0	100	97,5
5	57,3	59,2
10	37,7	36
15	20	21,7
20	14	13,2

Einige Versuche, die ich über die Zersetzung des Tetanolysins in Gegenwart von Säuren und Basen angestellt habe, gaben folgende Resultate. Zusatz äquimolekularer Mengen (etwa 0,003 molnormal) von Salzsäure, Oxalsäure, Zitronen- und Weinsäure beschleunigte die Reaktionsgeschwindigkeit so stark, daß der Zerfall einer 1prozentigen Tetanolysinlösung in 10 Minuten zu $^3/_4$ vollendet war. Von Schwefelsäure genügt die halbe Menge für dieselbe Wirkung, und von Essigsäure wurde eine 75mal größere Menge erfordert. Die erwähnten Konzentrationen enthalten alle nahezu die gleiche Menge Wasserstoffionen, und es scheint daher wahrscheinlich, daß die Wasserstoffionen die Träger der katalytischen Wirkung sind. Natriumhydroxyd wirkt beinahe ebenso stark wie eine starke Säure von derselben molekularen Konzentration, und Ammoniaklösung in gleicher Konzentration hat einen sehr geringen Einfluß, sie mußte in etwa 30facher Konzentration angewandt werden, um dieselbe Wirkung wie Ätznatron auszuüben. Diese beiden Lösungen haben annähernd dieselbe Konzentration in bezug auf Hydroxylionen.

Mit Hilfe dieser Erfahrungen ist es leicht, eine von Ritchie[1]) beobachtete Erscheinung zu interpretieren. Er vermischte eine Tetanolysinlösung bei gewöhnlicher Zimmertemperatur mit einer kleinen Menge Salzsäure. Nach einer bestimmten Zeit injizierte er diese Mischung subkutan einem Meerschweinchen. Das Tier starb nicht an dem Gifte, wohl aber starb es, wenn die Salzsäure vor der Injektion durch Natronlauge neutralisiert wurde. Ritchie meint, das Tetanolysin würde durch die Säure zerstört und durch den Zusatz der Base wieder hergestellt. Die einfache Erklärung ist die folgende: Die zugesetzte Säuremenge war nicht genügend, um bei der niedrigen Zimmertemperatur eine rasche Zerstörung des Tetanolysins herbeizuführen. Nach der Injektion stieg die Temperatur der Mischung schnell

[1]) Ritchie, Journ. of Hygiene, 1904.

Digitized by Google

auf etwa 37°, und die Zerstörung des Tetanolysins ging mit großer Geschwindigkeit vor sich, nach den oben gegebenen Zahlen etwa 200000 mal schneller als bei 20°. Das Gift wurde daher fast augenblicklich zerstört ehe es Zeit gehabt hatte, in den Körper des Tieres zu diffundieren, und hatte keine merkliche Wirkung. Aber wenn die Mischung vor der Injektion bei Zimmertemperatur durch Zusatz einer äquivalenten Menge Natriumhydroxyd neutralisiert wurde, so wurde das Gift nach der Injektion nicht zerstört und übte seine tödliche Wirkung aus. Es ist gar nicht nötig, einen so wunderbaren Vorgang, wie die Wiederherstellung zerstörter Toxinmoleküle durch den Zusatz der Base anzunehmen.

Mit Antitoxinen sind sehr wenige Untersuchungen ausgeführt, die ihre Zerstörung mit der Zeit betreffen. Madsen fand für Antiricin (Serum einer Injektionen unterworfenen Ziege), daß die Stärke bei Zimmertemperatur in 47 Tagen auf 40% und in 89 Tagen auf 19,6% zurückging, was ziemlich nahe einem monomolekularen Prozeß entspricht, d. h. die Geschwindigkeit der Kraftabnahme war der Kraft selbst proportional.

Die größte Zunahme einer Reaktion, die je gefunden worden ist, betrifft die Zersetzung von Hämolysin, das in normalem Ziegenserum enthalten ist und Kaninchen-Erythrocyten auflöst.

Zerfall eines Hämolysins bei 53° und 51° (Madsen und Famulener).

t (Min.)	q beob.	q ber.	t (Min.)	q beob.	q ber.
0	100	100	0	100	100
2,5	58,3	58,2	5	74,3	73,4
5	44,3	33,4	10	58,3	62,5
7,5	17,9	19,3	15	48,8	53,3
			20	44,9	45,4
			25	40,0	38,7
			30	33,7	33,0
			35	28,4	28,1
			40	25,2	24,0

μ ergibt sich zu 198500 für diese Reaktion. Mit Hilfe dieser Zahl ist folgende kleine Tabelle berechnet.

Einfluß der Temperatur auf den Zerfall eines Hämolysins.

Temp.	x beob.	x ber.
53	0,095	0,095
52,5	0,060	0,060
52	0,038	0,038
51,5	0,025	0,024
51	0,0139	0,0145

Hier beobachten wir deutlich zwei nebeneinander laufende Prozesse. Der Prozeß, der den beobachteten Zahlen entspricht, ist wahr-

Digitized by Google

scheinlich der Zerfall des Hämolysins in Immunkörper und Alexin, und das Alexin wird noch schneller zerstört. Aber auch das umgekehrte kann richtig sein. Die Zahlen zeigen, daß eine Erhitzung auf 60° C von 0,1 Minute das Hämolysin praktisch vollständig zerlegen und eine Lösung von alexinfreiem Immunkörper geben wird.

Die erste Enzymwirkung, die nach den Methoden der physikalischen Chemie studiert worden ist, und zwar von Tammann,[1]) war die Wirkung von Emulsin auf Salicin. Sie scheint verwickelter Art zu sein. Der Prozeß scheint bei niederer Temperatur monomolekular zu verlaufen, wie folgende Zahlen zeigen, die die Stärke (Konzentration) einer Lösung mit einem Anfangsgehalt von 3,007 g Salicin und 0,08 g Emulsin in 100 ccm angeben.

Zersetzung von Salicin durch Emulsin bei 25°.

t (Stunden)	Stärke beob.	Stärke ber.	
0	100	100	
1	87	88	
3	68	67	
5	42	52	$\varkappa = 0{,}057$
8	35	35	
12	24	21	
26	9	3	

Aus den untersten Zahlen scheint hervorzugehen, daß der Vorgang gegen Schluß verzögert wird. Bei höheren Temperaturen tritt das noch deutlicher hervor. Wir dürfen daher die Genauigkeit des aus Tammanns Zahlen berechneten μ nicht überschätzen, das sich zu $\mu = 3330$[2]) ergibt, entsprechend einer Zunahme im Verhältnis von nur 1,2 : 1 für ein Intervall von 10°.

Tammann untersuchte auch die langsame Zersetzung von Emulsin in 0,5 prozentiger Lösung und in Form eines trocknen Pulvers. Auch hier war die Reaktion monomolekular. Der Emulsingehalt der Lösung und des Pulvers zu verschiedenen Zeiten wurde mit Hilfe der zersetzenden Wirkung auf Salicin bestimmt.

Zersetzung einer 0,5 prozentigen Lösung von Emulsin.

Temp.	$\varkappa$ beob.	$\varkappa$ ber.	
40	0,04	0,011	
50	0,18	0,099	
60	0,80	0,80	
65	2,86	2,18	$\mu = 45000$
70	5,9	5,74	
75	14,7	14,7	

[1]) Tammann, Zeitschr. f. phys. Chemie, 18, 436 (1895).

[2]) Tammann gibt $\mu = 2A = 5870$, was offenbar ein Druckfehler oder ähnliches Versehen ist.

Digitized by Google

Es ergab sich zwischen 60 und 75° für die Lösung $\mu = 45000$, entsprechend einer Zunahme im Verhältnis 7 : 1 im Intervall von 10°. (Die Bestimmung ist ziemlich unsicher.) Ferner verläuft die Zersetzung des Pulvers bei 80,5° etwa 500 mal langsamer, als die der 0,5 prozentigen Lösung. Wie sich im folgenden zeigen wird, verhält sich Lab sehr ähnlich, und es scheint eine sehr allgemeine Beobachtung zu sein, daß die Substanzen, mit denen wir uns hier beschäftigen, in trockner Form gegen Hitze viel beständiger als in Lösung sind. Das erinnert bis zu einem gewissen Grade an die große Widerstandsfähigkeit getrockneter Sporen gegen hohe Temperatur, verglichen mit dem starken, zerstörenden Einfluß höherer Temperaturen auf entwickelte Bazillen, die Flüssigkeiten enthalten.

Was die katalytische Wirkung der Fermente betrifft, so hat Dr. Euler[1]) die experimentellen Daten berechnet. In den meisten Fällen finden wir, daß der zeitliche Verlauf der Reaktion durch einen monomolekularen Prozeß dargestellt werden kann. So findet er z. B. für die Zersetzung von Wasserstoffsuperoxyd (H_2O_2) durch Lösungen, die 3, 4 und 5 ccm Saft von Boletus scaber in 200 ccm enthalten, folgende Werte bei 15°.[2]) q ist die Menge H_2O_2, die durch Titration mit 0,01 n $KMnO_4$ festgestellt wurde; n ist die Konzentration der „Katalase", t die Zeit in Minuten.

n = 3			n = 4			n = 5		
t	q	$\varkappa$	t	q	$\varkappa$	t	q	$\varkappa$
0	8,0	—	0	8,0	—	0	8,2	—
6	6,9	0,0107	8	6,2	0,0138	2	7,5	0,0193
12	5,8	0,0116	10	5,6	0,0154	7	6,0	0,0193
19	5,0	0,0107	13	5,1	0,0150	16	4,0	0,0195
55	2,5	0,0100	19	4,2	0,0147	22	3,15	0,0190
		0,0107			0,0147			0,0193

Die Reaktionskonstante $\varkappa$, berechnet für eine monomolekulare Reaktion, wächst mit der Konzentration n, und zwar etwas schneller als proportional. Ebenso verhält sich, nach den Untersuchungen von Bredig und Müller von Berneck, die katalytische Wirkung einer kolloidalen Platinlösung auf Wasserstoffsuperoxyd.

In analoger Weise wirkt die aus Schweinefett extrahierte Katalase verseifend auf eine konzentrierte Lösung von Äthylbutyrat bei 35°, nach Eulers Messungen. q ist die Menge Buttersäure, die nach t Minuten frei geworden ist, bestimmt durch Titration mit Barythydrat.

[1]) Euler, Katalyse durch Fermente, Zeitschr. f. physiol. Chemie 45, 420 (1905).

[2]) Euler, Zur Kenntnis der Katalasen, Beiträge z. chem. Physiologie 7, Heft 1—3, 1905.

Digitized by Google

t	q	$q_\infty - q$	x
0	0	2,70	—
2	0,3	2,40	0,0256
6	0,75	1,95	0,0235
9	1,05	1,65	0,0237
16	1,65	1,05	0,0250
∞	2,70	—	—
			0,0245

Die Reaktion ist deutlich monomolekular, wie die Konstanz von x zeigt.

Eine kompliziertere Formel ist empirisch von Henri[1]) für die Rohrzuckerinversion, hervorgebracht durch aus Hefezellen extrahiertes Invertin, gültig befunden worden. Henris Formel ist:

$$x_1 = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}.$$

Sie unterscheidet sich von der Formel der monomolekularen Reaktion dadurch, daß im Zähler des Logarithmus der Ausdruck $(a+x)$ an Stelle von einfach a steht. Als Beispiel mag die Reaktion von 4 ccm Diastaselösung mit 0,5 normal Zucker bei 25° dienen. $\frac{x}{a}$ ist das Verhältnis des invertierten Zuckers zur ursprünglichen Rohrzuckermenge.

t (Min.)	$\frac{x}{a}$	$x = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$x_1 = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$
75	0,037	0,000 218	0,000 22
186	0,103	254	24
499	0,228	281	25
505	0,292	297	26
557	0,322	303	26
1120	0,589	345	26
1172	0,611	350	26

Während x mit der Zeit regelmäßig wächst, so daß sich die äußersten Werte wie 1:1,6 verhalten, ist x_1 nahezu konstant. Die in bestimmter Zeit umgewandelte Menge ist der vorhandenen Diastasemenge proportional, nicht aber der Konzentration des Rohrzuckers in der Lösung. In einem ziemlichen großen Gebiet (0,15—0,6 n) ist die umgesetzte Menge unabhängig von der Rohrzuckerkonzentration, wie Duclaux angegeben hat, aber bei hoher und niedriger Konzentration finden wir niedrigere Werte, als bei mittlerer. Bei sehr niedrigen

[1]) Henri, Zeitschr. f. phys. Chemie 39, 194 (1901).

Digitized by Google

Konzentrationen ist die umgesetzte Menge proportional der Konzentration des Rohrzuckers.[1])

Einige alte Beobachtungen von Kjeldahl[2]) behandeln den Einfluß der Temperatur auf die Wirkung, die Invertin auf Rohrzucker ausübt. Sie ergeben ein Optimum bei etwa 52,5° und $\mu = 9080$. Folgende Tabelle gibt sie wieder:

Temperatur . . .	0	18	30	40	45	48° C
Geschwindigkeit$_{beob.}$	17	60	113	179	228	250
Geschwindigkeit$_{ber.}$	21	(60)	112	181	(228)	261
Temperatur . . .	50	52,5	55	60	65	70° C
Geschwindigkeit$_{beob.}$	260	267	260	179	21	0
Geschwindigkeit$_{ber.}$	285	318	353	436	534	651

Auch in einigen andren Fällen ist die Formel von Henri bestätigt worden. Doch scheint wahrscheinlich, daß in verdünnten Zuckerlösungen die Reaktion dem reinen monomolekularen Typus angehört. Erst bei höheren Konzentrationen treten Abweichungen auf. Barendrecht[3]) hat eine eigentümliche Theorie gegeben, wonach die Abweichungen dem zuzuschreiben wären, daß die Zuckermoleküle eine Art Strahlung, die vom Enzym emaniert, absorbieren. Diese Strahlung soll die Inversion hervorrufen. Es ist hier nicht der Ort, näher auf diese merkwürdige Ansicht einzugehen.

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit analysiert Henri[4]) die Hydrolyse der Maltose durch Maltase. Hier ist das Reaktionsprodukt Glukose und die Reaktionskonstante wächst mit dem Fortschritt der Reaktion. Henris Formel $\varkappa = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$ gibt einen sehr konstanten Wert für $\varkappa$. Diese Konstante nimmt ab, wenn die Maltosemenge zunimmt. Z. B. geben Lösungen folgender Konzentration folgende $\varkappa$-Werte für die ersten drei Stunden: 2%-Lösung, $\varkappa = 368 \cdot 10^{-5}$. 4%-Lösung, $\varkappa = 164 \cdot 10^{-5}$. 6%-Lösung, $\varkappa = 106 \cdot 10^{-5}$. $\varkappa$ ist der anwesenden Maltosemenge nahezu umgekehrt proportional. Es wäre daher zweckmäßig zu setzen:

$$\varkappa = \frac{\varkappa_2}{a - x}$$

---

[1]) Adrian Brown, Journ. Chem. Soc. **81**, 387 (1902).

[2]) Kjeldahl, zitiert nach Duclaux, Traité de microbiologie **2**, 177 (1899).

[3]) Barendrecht, Zeitschr. f. phys. Chemie **49**, 456 (1904).

[4]) Victor Henri, Recherches physico-chimiques sur les diastases. Archivio di Fisiologia **2**, 1 (Nov. 1904).

Digitized by Google

wo $\varkappa_2$ eine neue Konstante ist und $(a - x)$ die Konzentration der Maltose. Aber wie die Maltose hat auch die Glukose einen verzögernden Einfluß auf die Reaktion, und daher wäre es rationeller zu setzen:

$$\varkappa = \frac{\varkappa_2}{(a-x)+nx} \text{ und: } \frac{dx}{dt} = \frac{\varkappa_2 (a-x)}{(a-x)+nx}$$

was integriert die Bodensteinsche Formel gibt:

$$\varkappa_2 t = a\left\{(1-n)\frac{x}{a} + n \log \text{nat} \frac{a}{a-x}\right\}$$

Hier finden wir, wie Henri gezeigt hat, eine genügende Übereinstimmung mit den Resultaten der Beobachtung, wenn wir $n = 0{,}33$ setzen. Bei der Einwirkung von Invertin auf Saccharose ist $n = 0{,}5$ und bei der Einwirkung von Emulsin auf Salizin $n = 2$. Natürlich ist die Einführung einer neuen Konstante n der Übereinstimmung zwischen Versuch und Rechnung immer günstig. Doch findet Henri die Übereinstimmung bei Maltose nicht sehr befriedigend; $\varkappa_2$ schwankt zwischen 0,028 und 0,046.

Henri schlägt daher vor, noch eine neue empirische Konstante in die Gleichung für $\varkappa_2$ einzuführen. Aber es ist zu befürchten, daß die Berechnung die aufgewandte Arbeit nicht wert ist, so lange die Versuche so widersprechend sind wie jetzt. Ich habe z. B. einige Versuche von Herrn Terroine, die Henri zitiert,[1]) nach seiner Formel berechnet, und finde $\varkappa$ sehr nahezu konstant $= 564 \cdot 10^{-5}$, wie aus den folgenden Zahlen ersichtlich ist, die für eine 2prozentige Lösung von Maltose gelten:

Maltose 2% (Terroine)				Maltose 5% bei 30° (E. T. Armstrong)		
t (Min.)	x%	$\varkappa = \frac{1}{t} l \frac{100+x}{100-x}$	$\varkappa_1 = \frac{1}{t} l \frac{100}{100-x}$	t (Std.)	x%	$\varkappa_1 = \frac{1}{t} l \frac{100}{100-x}$
62	0,373	$549 \cdot 10^{-5}$	$327 \cdot 10^{-5}$	1	7,3	0,0329
90	0,515	550	349	2	13,9	0,0325
120	0,656	569	389	4	24,4	0,0304
150	0,772	593	428	7,25	31,7	0,0229
176	0,832	589	440	23	35,2	0,0082
210	0,860	535	407			
240	0,914	561	444			
362	0,965	(483)	402			

Nach Terroines Zahlen schwankt $\varkappa$ nicht mehr als 10%; der letzte Wert, wo nur noch 3,5% von der Maltose übrig sind, ist zu

[1]) l. c. S. 6.

Digitized by Google

unzuverlässig, um für die Rechnung benutzt werden zu können. Aber auf S. 4 derselben Abhandlung gibt Henri Zahlen für eine 2prozentige Maltoselösung, nach denen die Werte für $\varkappa$ zwischen $319 \cdot 10^{-5}$ und $489 \cdot 10^{-5}$ schwanken, d. i. um 53%. Die Versuchsfehler müssen daher groß sein, und die Zahlen können noch nicht zu minutiösen Rechnungen gebraucht werden. Noch größer ist der Widerspruch gegen Zahlen von Armstrong,[1]) der findet, daß die Konstante $\varkappa_1$, berechnet nach der Formel der monomolekularen Reaktion, mit dem Fortschritt der Reaktion abnimmt, während Henri findet, daß $\varkappa$, berechnet nach seiner Formel, nahezu konstant ist, d. h. daß $\varkappa_1$ mit dem Fortschritt der Reaktion rasch anwächst, wie aus den Zahlen oben ersichtlich ist, und das gilt nicht nur für 2%, sondern in noch höherem Grade für 4% und 6%-Lösungen.[2])

Armstrong teilt einige andre Messungen mit, die die Zerstörung von Milchzucker durch Laktase oder Emulsin behandeln, und die ein von Henris Formel ganz abweichendes Gesetz ergeben. Die Regelmäßigkeit wird nur dann deutlich, wenn das Enzym in großer Menge anwesend ist. Wir geben nur die ersten zwei Tabellen (I und VII), die die hydrolytische Wirkung von 100 ccm Laktase-Extrakt und von 0,2 g Emulsin auf 2 g Milchzucker bei 36° betreffen:

Wirkung von Laktase auf Milchzucker.

t (Std.)	x%	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
1	22,1	22,1
2	31,2	22,0
3	38,9	22,5
4	45,8	22,9
5	51,5	23,0
6	56,6	23,1
10	69,0	21,8
17	84,2	20,4
23	92,4	19,3
29	95,3	17,7
38	98,0	15,9

Wirkung von Emulsin auf Milchzucker.

t (Std.)	x%	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
0,5	3,2	4,5
1	4,8	4,8
2	6,4	4,5
3	7,6	4,4
4,5	9,0	4,2
6	10,0	4,1
23	19,7	4,1
29	22,0	4,1
48	29,0	4,2
53	30,7	4,2
144	62,2	5,2
264	77,5	2,9

Hier ist die umgewandelte Menge der Quadratwurzel aus der Reaktionszeit ziemlich genau proportional. Das entspricht der Differentialgleichung:

---

[1]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 73, 508 (1904).

[2]) Brown und Glendinning, Journ. chem. soc. 81, 388 (1902), finden Henris Formel auch bei der Hydrolyse löslicher Stärke durch Diastase bestätigt.

Digitized by Google

$$\frac{dx}{dt} = \frac{x}{x} = \frac{x(a-x)}{x(a-x)}$$

Mit andren Worten, die nach der allgemeinen Formel für monomolekulare Reaktionen berechnete Konstante wäre umgekehrt proportional dem Produkt aus dem Rest des Milchzuckers und den Reaktionsprodukten. Das wird eintreten, vorausgesetzt, daß die Reaktionsprodukte in genügender Menge vorhanden sind, wenn ein Milchzuckermolekül und ein Molekül der Reaktionsprodukte mit einem Molekül des Enzyms zu einer partiell dissoziierbaren Verbindung zusammentreten.

Es ist schon lange bekannt, daß sich die Enzyme von den chemischen Katalysatoren in einem wichtigen Punkt unterscheiden. Duclaux[1]) stellte 1883 folgenden Versuch an: Lösungen, die je 10, 20 und 40 g Zucker in 100 ccm enthalten, werden mit 20 mg Invertin versetzt und auf eine Temperatur von 37° gebracht. Nach 4 Stunden findet man, daß bei allen drei Konzentrationen nahezu dieselbe Menge (etwa 5 g) Zucker hydrolysiert ist. Hätten wir hingegen 20 mg einer Säure zugesetzt, so wäre die invertierte Menge 2,5 g bei der ersten und 5 g bei der zweiten Konzentration gewesen, wenn sie bei der dritten 10 g betragen hätte. Armstrong[2]) gibt einige gute Beispiele für diese Regel, die nur dann gilt, wenn die Enzymmenge klein ist. Die Tabellen enthalten die Anzahl g hydrolysierten Milchzuckers in 100 ccm:

% Gehalt der Lösung an Milchzucker	g Milchzucker hydrolysiert durch eine kleine Menge Laktase in			Emulsin in	
	24h	46h	144h	23h	48h
10	1,42	2,22	3,34	1,97	2,98
20	1,40	2,18	3,38	2,12	3,06
40	1,44	2,21	3,30	2,10	3,06

Andrerseits ist bei Gegenwart großer Enzym- und verhältnismäßig kleiner Zuckermengen die Wirkung der Zuckermenge proportional, genau wie bei der Säurewirkung.

Einwirkung von Invertin auf 100 ccm Zuckerlösung (Brown).		Einwirkung von Laktase auf 100 ccm Milchzuckerlösung (Armstrong).	
% Saccharose	g in 1 Std. invertiert	% Milchzucker	in 3 Std. umges. Menge
0,25	0,060	0,2	0,042
0,5	0,129	0,5	0,098
1,0	0,249	1,0	0,185

[1]) Duclaux, Traité de micrologie 2, 136 (1899).
[2]) Armstrong, l. c. S. 508—510.

Digitized by Google

Wenn das Enzym in kleiner Menge zugegen ist, so ist die umgewandelte Menge der Enzymmenge proportional, wie folgende Versuche von O'Sullivan und Tompson[1]) und Armstrong zeigen.

Hydrolyse von Rohrzucker bis zu 24 % mittels Invertin bei 15,5°
(O'Sullivan und Tompson).

0,15 g	Invertin	283 Min.	(ber. 307)
0,45 „	„	94,8 „	(„ 92,1)
1,5 „	„	30,7 „	(„ 30,7)

Hydrolyse einer 5proz. Milchzuckerlösung (100 ccm).

Gehalt der Lösung			Nach 24 Std.
0,66 ccm	Laktase		2,3 %
1	„	„	3,2 %
2	„	„	6,3 %
5	„	„	15,4 %

Ein sehr gutes Beispiel ist von Henri[2]) gegeben, nämlich die Inversion von Rohrzucker mittels Invertins von konstanter Konzentration. Folgende Tabelle gibt die Anzahl n der Milligramme, die nach der ersten Minute in einer c-normalen Rohrzuckerlösung (1-normal = 342 g p. Liter) invertiert waren:

c = 0,01	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2
n = 0,58	1,41	2,40	2,96	4,65	5,04	4,45	2,82	1,15

Wie diese Zahlen zeigen, ist n zunächst proportional c, erreicht dann bei etwa 0,5 ein Maximum, um bei hohen Konzentrationen, bei denen das Lösungsmittel als verändert angesehen werden kann, wieder zu sinken.

Mit diesem Versuch stimmt der Befund Terroines gut überein, daß die (von einer gegebenen) Menge Maltase in 100 ccm Lösung umgewandelte Menge Maltose annähernd proportional der Maltosekonzentration ist, bis diese etwa 2 % erreicht, und darauf unabhängig von der Konzentration wird.

Diese Gesetzmäßigkeit läßt sich schon in Versuchen entdecken, die Tammann[3]) 1889 über die Zersetzung verschiedener Amygdalinmengen durch eine konstante Emulsinmenge ausführte.

Zersetzung von Amygdalin durch Emulsin.

Amygdalinmenge	2,555	5,11	10,22 g
t (Min.) = 14	0,61	0,61	0,50
19	0,77	0,85	0,73
23	0,79	0,98	0,86

[1]) O'Sullivan und Tompson, ebenda, **57**, 865 (1890).

[2]) Henri, Lois générales de l'action des diastases, Thèse Paris 1899.

[3]) Tammann, Zeitschr. für physikalische Chemie **3**, 33 (1889). Hoppe-Seylers Zeitschr. **16**, 315 (1892).

Digitized by Google

Alle diese Versuche führen uns zu der Annahme, daß die Substanz, die hier in Wirklichkeit in die Reaktionsprodukte zerfällt, eine Verbindung des Enzyms mit den Substanzen ist, auf die es wirkt. Wenn in diesen Fällen das Enzym im Überschuß ist, so geht fast die ganze Menge der Substanz, auf die es reagiert, in die Verbindung ein, deren Menge daher der Menge dieser Substanz proportional ist. Wenn andrerseits diese Substanz im Überschuß ist, so ist die Menge der Verbindung der Menge des Enzyms annähernd proportional. Wir können daher aus diesen Versuchen Schlüsse über die Enzymmenge ziehen, die einer bestimmten Menge Rohrzucker oder Milchzucker äquivalent sind. Diese Schlüsse weisen darauf hin, daß die Äquivalentgewichte der Enzyme nicht so hoch sind, wie oft angenommen wird. Der Umstand, daß Enzyme im allgemeinen keine reinen Substanzen sind, hindert die Auswertung ihrer wahren Äquivalentgewichte.

Die Formel von Bodenstein und Henri kann folgendermaßen abgeleitet werden.[1]) Die Menge Ferment bei Beginn mag F genannt werden, die der zerfallenden Substanz A. Davon möge ein Teil x zerfallen sein, so daß nur (A — x) übrig ist. Das Ferment, die Substanz A und die Reaktionsprodukte mögen Verbindungen eingehen, die aus 1 Molekül Ferment, p Molekülen A und q Molekülen der verschiedenen Reaktionsprodukte bestehen. Von diesen Verbindungen mögen z, z_1 usw. Moleküle zugegen sein. Dann gilt für jede einzelne solche Molekülart eine Formel von folgender Form:

$$z = \varkappa F_1 (A - x - \Sigma p z)^p (x - \Sigma q z)^q, \text{ wo } F = F_1 + \Sigma z.$$

Wenn wir annehmen, daß Σz klein gegen A und x ist, so erhalten wir:

$$z = \varkappa F_1 (A - x)^p x^q.$$

Ferner erhalten wir:

$$\frac{dx}{dt} = \varkappa_1 F_1 (A - x - \Sigma p z)^a = \frac{\varkappa_1 F (A - x)^a}{1 + \Sigma \varkappa (A - x)^p x^q}$$

In vielen Fällen ist das erste Glied im Nenner, 1, klein gegen die Glieder unter dem Summationszeichen. Dann erhalten wir die Formel von Bodenstein, wenn wir $a = 1$ setzen und annehmen, daß unter Σ zwei Glieder stehen, eins in dem $p = 1$ und $q = 0$ ist, ein

[1]) vgl. Henri, C. r. **135**, 916.

Digitized by Google

zweites in dem $p = 0$ und $q = 1$ ist. In fast allen bisher untersuchten Fällen ist die Reaktionsgeschwindigkeit der ersten Potenz des anwesenden Enzyms proportional, daher ist die Ableitung unter dieser Annahme gegeben. Die allgemeine Formel, in die die Konzentration mit einer andren Potenz als 1 eingeht, ist sehr kompliziert. Ein häufiger Fall ist, daß unter dem Zeichen Σ nur ein Glied mit $p = 0$ und $q = 1$ steht. So verhält es sich bei der Eiweißverdauung mittels Pepsin und Trypsin und bei der Hydrolyse der Fette mittels Lipasen. Hier kann sogar das Glied 1 weggelassen werden. Dasselbe gilt für Armstrongs Versuche, bei denen das Reaktionsprodukt der Quadratwurzel aus der Reaktionszeit proportional ist. Hier ist $p = 1$ und $q = 1$, d. h. der Haupteinfluß rührt von der Bildung einer Verbindung her, zu der Enzym, Reaktionsprodukt und Ausgangssubstanz zu gleichen Molekülen zusammentreten. Die Formel gilt offenbar nicht, wenn die Substanz, auf die das Enzym oder das Reaktionsprodukt wirkt, zum großen Teil von Enzym gebunden ist. Daher gibt die Formel bei Terroines Versuchen mit kleinen Maltosemengen keine guten Resultate. Es müßten viele Versuche ausgeführt werden, um diese Auffassung zu bestätigen, die mir gegenwärtig der beste Ausdruck unserer Kenntnisse zu sein scheint.

Eine der interessantesten Untersuchungen auf diesem Gebiet wurde schon 1895 von Sjöqvist[1]) ausgeführt. Er löste 2,23 g Eieralbumin, das durch Dialyse von Salzen nahezu befreit war, in 100 ccm einer Lösung auf, die 0,005 Grammoleküle (= 0,1875 g) HCl und 2,5, 5, 10 oder 20 ccm Pepsin enthielt. In diesem homogenen System wurde das Albumin bei 37° allmählich verdaut. Gleichzeitig nahm die Leitfähigkeit allmählich ab, und diese Abnahme wurde als Maß der verdauten Menge angesehen. In bestimmten Zwischenräumen wurden Proben aus der Lösung genommen und schnell auf 18° abgekühlt, bei welcher Temperatur die Verdauungsgeschwindigkeit praktisch vernachlässigt werden konnte. Die Leitfähigkeit wurde bei dieser Temperatur in gewöhnlicher Weise bestimmt.

Er fand folgende Zahlen; μ ist die Leitfähigkeit, Δ ihre Abnahme, $\Delta_{ber.}$ die entsprechende berechnete Größe und $f = \frac{2{,}236\ \Delta}{\sqrt{P}}$, wo P die Konzentration des Pepsins ist. Die eingeklammerten Zahlen sind interpoliert.

---

[1]) Sjöqvist, Scandin. Archiv f. Physiologie 5 (1895).

Digitized by Google

Verdauung von Eieralbumin durch HCl und Pepsin bei 37°:

Zeit (Stunden)	P = 0,025 %				P = 0,05 %			
	μ	Δ	$\Delta_{ber.}$	f	μ	Δ	$\Delta_{ber.}$	f
0	188,4	—	—	—	188,4	—	—	—
0,5	—	—	5,3	—	—	—	7,8	—
1	—	—	7,8	—	178,2	10,2	10,5	102
2	177,3	11,1	10,5	157	172,8	15,6	15,6	156
4	171,1	17,3	15,6	245	164,7	23,7	21,6	237
6	167,4	21,0	(19,6)	297	159,5	28,9	(26,9)	289
8	164,5	(23,9)	21,6	338	155,5	(32,9)	29,7	329
9	163,1	25,3	(23,0)	358	153,5	34,9	(33,7)	349
12	159,9	28,5	(26,9)	403	149,4	39,0	(36,6)	390
16	156,4	(32,0)	29,7	452	145,2	(43,2)	41,6	432
20	152,9	35,5	(34,7)	502	141,0	47,4	(46,8)	474
32	146,2	42,2	(41,6)	597	133,1	(55,3)	(53,1)	553
48	139,8	(48,6)	(48,8)	673	126,2	(62,2)	(61,2)	622
64	135,0	(53,4)	53,1	755	121,4	(67,0)	68,2	670
96	127,9	60,5	(61,2)	856	114,4	74,0	(77,0)	740

Zeit (Stunden)	P = 0,1 %				P = 0,2 %			
	μ	Δ	$\Delta_{ber.}$	f	μ	Δ	$\Delta_{ber.}$	f
0	188,4	—	—	—	188,4	—	—	—
0,5	179,2	9,2	10,5	65	176,0	12,4	15,6	62
1	174,2	14,2	15,6	100	167,8	20,6	21,6	103
2	165,9	22,5	21,6	160	157,9	30,3	29,7	153
4	154,8	33,6	29,7	237	144,5	43,9	41,6	220
6	148,0	40,4	(36,6)	286	137,2	51,2	49,2	256
8	143,2	(45,2)	41,6	320	133,0	(55,4)	53,1	277
9	140,8	47,6	(44,5)	337	130,1	58,3	55,7	292
12	136,1	52,3	49,2	370	125,8	62,6	61,1	313
16	130,9	(57,5)	53,1	407	121,6	(66,8)	68,2	334
20	125,7	62,7	(58,6)	443	117,3	71,7	73,3	356
32	119,4	(69,0)	68,2	488	109,8	78,6	83,7	393
48	113,1	75,3	(77,0)	533	102,3	86,1	91,8	431
64	109,1	(79,3)	83,7	561	97,4	(91,0)	96,5	455
96	101,8	86,6	91,8	612	91,2	97,2	101,4	486

Sjöqvist fand f für kleine und gleiche Werte von t nahezu konstant, mit andren Worten: Die Menge umgewandelten Eialbumins ist der Quadratwurzel des Pepsins proportional. Aber es findet sich eine andre Beziehung, die sich auch für lange Reaktionszeiten bestätigt: die verdaute Albuminmenge ist nur eine Funktion von Pt, d. h., die Pepsinmenge n verdaut in der Zeit $\frac{t}{n}$ dieselbe Menge, wie

Digitized by Google

die Mengeneinheit Pepsin in der Zeit t. Das ergibt sich aus folgender kleiner Tabelle:

Pt =	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	4,8	6,4	9,6
P = 0,025	11,1	17,3	23,9	32,0	42,2	53,4	—	—	—	—
0,05	10,2	15,6	23,7	32,9	43,2	55,3	67,0	74,0	—	—
0,1	9,2	14,2	22,5	33,6	45,2	57,5	69,0	75,3	79,3	86,6
0,2	—	12,4	20,6	30,3	43,7	55,4	66,8	73,6	78,6	86,1
Mittel	10,2	14,9	22,7	32,2	43,8	55,4	67,6	74,3	79,0	86,4
ν	11	15,6	22	31,1	44					

Hieraus folgt, wie auch aus den Mittelwerten zu ersehen ist, daß, solange Pt einen bestimmten Wert (1,0) nicht überschreitet, die verdaute Albuminmenge tatsächlich der Quadratwurzel aus Pt proportional ist. Man sieht es auch an den berechneten Werten ν, die unter den mittleren stehen.

Es ist auch möglich, eine einfache Differentialgleichung aufzustellen, die den Fortschritt der Verdauung mit der Zeit sehr nahe wiedergibt. Sie hat folgende Form:

$$-\frac{dx}{dt} = \varkappa \frac{x}{A-x} P$$

wo x die anwesende Menge Eialbumin darstellt oder, genauer, die Menge seines chlorwasserstoffsauren Salzes. Die Abnahme dieser Menge, oder die damit verbundene Vermehrung der Albumose, kann durch die Leitfähigkeit der Lösung gemessen werden, so daß $\Delta = (A - x)$ die von der Albumose gebundene Menge Chlorwasserstoffsäure darstellt. Der Prozeß nähert sich einer bestimmten Grenze; sie läßt sich aus den Versuchen zu $\Delta = 105$ bestimmen. Von diesem Punkt aus muß x gezählt werden, daher: $x = \mu - 83{,}4$. $-\frac{dx}{dt}$ stellt den Leitfähigkeitsrückgang in der Zeiteinheit dar, der der Verdauungsgeschwindigkeit proportional ist. Die Gleichung besagt, daß die Verdauungsgeschwindigkeit proportional der an Chlorwasserstoffsäure gebundenen Menge Eialbumin, vom Grenzwert an gerechnet, und umgekehrt proportional der schon verdauten Menge ist. Letzteres kann man folgendermaßen erklären: Bei der Verdauung werden, wie erwähnt, Albumosen und Peptone gebildet, und ihre Menge ist der Menge gebundener Chlorwasserstoffsäure proportional. Das Pepsin wird zum größten Teil von den Reaktionsprodukten gebunden, und es herrscht das Gleichgewicht: (Freies Pepsin) · (Reaktionsprodukt) = Konst. · (Gebundenes Pepsin). Die freie Pepsinmenge ist der Menge der gebildeten Reaktionsprodukte d. h. $(A - x)$ nahezu umgekehrt pro-

Digitized by Google

portional. Das gilt, sobald soviel Reaktionsprodukte gebildet sind, daß ihr Hauptteil nicht vom Pepsin gebunden ist, während umgekehrt der Hauptteil des Pepsins gebunden ist. Weiter ist klar, daß die freie Pepsinmenge der angewandten Pepsinmenge P proportional ist.

Die Differentialgleichung gibt folgendes Integral:

$$A\ (\log A - \log x) + x - A = \varkappa \cdot P \cdot t$$

$\varkappa P$ ist hier 125, wenn P in Prozenten ausgedrückt ist ($A = 1000$).

Wenn x nahezu konstant ist, so erhält das Integral die Form

$$A - x = \sqrt{\varkappa P \cdot t}$$

d. h., die verdaute Menge ist der Quadratwurzel aus der Pepsinmenge und aus der Zeit umgekehrt proportional, wie Sjöqvist gefunden hat. Das ist schon von Schütz sen.[1]) beobachtet, und ist von Schütz jun.[2]) bestätigt worden, der die Pepsinmenge p, 10 ccm Eialbumin (enthaltend 1—1,2 g koagulierbare Substanz) und 29 ccm 1% HCl in 100 ccm auflöste. Nach einer Einwirkung von 15 Stunden bei 38° fand er folgende Mengen d verdautes Eiweiß, d. h. nicht koagulierbares Pepton:

p	$d_{beob.}$	$d_{ber.}$
1	0,0212	0,0213
4	0,0471	0,0426
9	0,0652	0,0639
16	0,0799	0,0852
25	0,0935	0,1065
36	0,1031	0,1278

Hier haben wir ein sehr hübsches Beispiel eines monomolekularen Vorganges, wo die Umwandlungsgeschwindigkeit sowohl der anwesenden Pepsinmenge, wie der anwesenden Menge Albuminsalz proportional ist, wo aber durch den störenden Einfluß eines der Reaktionsprodukte das einfache Gesetz der monomolekularen Reaktion verdeckt wird. Darin erinnert die Reaktion ziemlich stark an den von Ostwald[3]) studierten monomolekularen Vorgang der Umwandlung des Acetamids, oder den von mir[4]) untersuchten Prozeß der Äthylacetat-Verseifung durch Ammoniak.

In solchen Fällen erhält man eine Antwort auf die Frage, ob die Reaktion, ceteris paribus, der Menge q der reagierenden Substanz

[1]) Schütz sen., Zeitschr. f. physiol. Chemie 9, 577 (1885).
[2]) Schütz jun., ebenda, 30, 1 (1900).
[3]) Ostwald, Journ. f. praktische Chemie 27, 1 (1883).
[4]) Arrhenius, Zeitschr. f. physikal. Chemie 2, 289 (1888).

Digitized by Google

proportional ist, indem man untersucht, ob die umgesetzte Menge $(A - x)$ nur eine Funktion von $q \cdot t$ ist, dem Produkt aus der Menge der reagierenden Substanz in die Zeit. Wenn x nur abhängig von q^2t oder allgemein von f(q)t ist, so zeigt das in analoger Weise an, daß die Wirkung der betreffenden Substanz ihrem Quadrat oder im allgemeinen der Funktion f (q) proportional ist.

Mit Hilfe der Integralformel sind die berechneten Werte gefunden, die oben in der Tabelle neben die von Sjöqvist gefundenen gesetzt sind. Die Übereinstimmung ist sehr eng und zeigt, daß die Methode Sjöqvists sehr zweckmäßig war, sowie daß die theoretischen Ansichten in Übereinstimmung mit der Wirklichkeit sind. Es wäre wünschenswert, daß auch die Chlorwasserstoffmenge bei diesen Versuchen variiert worden wäre. Einige Versuche von Sjöqvist über die Verdauung in Gegenwart von andren Säuren als HCl, nämlich Schwefel-, Salpeter- und Phosphorsäure, scheinen zu zeigen, daß die Wirkung dieser Säuren etwa 16, 24 und 37% geringer als die der Salzsäure ist, aber mehr empirisches Material wäre zu wünschen, ehe man bestimmte Schlüsse ziehen möchte.

E. Schütz und Huppert[1]) verdanken wir eine große Anzahl Versuche über die Verdauung von Hühnereiweiß mittels Chlorwasserstoffsäure und Pepsin. Das Eiweiß war von Globulinen gereinigt. Der Einfluß der Säurekonzentration war folgender: wenn 1 g Eiweiß in 1000 ccm verdaut wurde, so nahm die in einer gegebenen Zeit verdaute Menge mit der Säuremenge zu, aber langsamer als proportional, bis deren Konzentration 0,2% betrug, darauf war sie nahezu konstant oder nahm zuweilen sogar etwas ab. Das stimmt mit der Auffassung überein, wonach die wirklich reagierende Substanz das Albumination ist, aber weitere Untersuchungen sind nötig, ehe irgend etwas mit Bestimmtheit gesagt werden kann.

In einer andren Versuchsreihe wurde die Temperatur varriiert. Der verdaute Anteil von 0,922 g Eiweiß in 100 ccm 0,2% HCl ergab sich zu:

bei 30 °C	0,544 g = 59,0%	ber. 59,0%
35 ° „	0,660 „ = 71,6 „	71,4 „
37,5° „	0,713 „ = 77,3 „	77,4 „
40 ° „	0,775 „ = 83,0 „	83,0 „

Mit Hilfe der Formel, die zur Berechnung der peptischen Verdauung gedient hat, habe ich μ ausgewertet und gleich 15570 gefunden und mit diesem Werte die angegebenen „berechneten“ Werte

[1]) Schütz und Huppert, Pflügers Archiv 80, 470 (1900).

Digitized by Google

bestimmt. Die Übereinstimmung ist sehr befriedigend, doch sind noch neue Untersuchungen nötig, um einen sicheren Wert für μ zu erhalten. Nach Schütz und Huppert hat der Prozeß um 50° ein Optimum.

Viele interessante Versuche über analoge Gegenstände sind im Dänischen Seruminstitut ausgeführt worden. Verschiedene Mengen (q ccm) Pepsin wurden zu 2 ccm einer Lösung von 7 prozentiger Thymolgelatine, 1 ccm einer 0,4 prozentigen HCl-Lösung und (1 — q) ccm einer 1 prozentigen NaCl-Lösung zugesetzt. Das Ganze wurde gemischt und kam in ein Probierröhrchen, das in einen Thermostaten von 36,6° C gesetzt wurde. Nach einer gegebenen Zeit (t Stunden) nahm man das Röhrchen heraus und stellte es bis zum folgenden Tag in einen Eisschrank (von etwa 3°). Die Proben, die wenig Pepsin enthielten, waren dann erstarrt, diejenigen mit viel Pepsin wegen der eingetretenen Verdauung dagegen flüssig. Es wurde die Menge q notiert und in die folgende Tabelle eingetragen, die gerade zur Verflüssigung der Gelatinemischung genügte.

Verdauende Wirkung des Pepsins auf Thymolgelatine.

t (Std.)	q	q t	t (Std.)	q	q t
1,33	0,60	0,80	8	0,13	1,04
2	0,47	0,94	10	0,095	0,95
3	0,30	0,90	12	0,08	0,96
4	0,26	1,04	14	0,07	0,98
6	0,18	1,08	20	0,045	0,90
			24	0,038	0,91

Der Durchschnittswert ist $q \cdot t = 0{,}96$ und die beobachteten Werte weichen nicht mehr davon ab, als durch Versuchsfehler erklärt werden kann.

Ganz ebenso wurden Versuche bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt und die beobachteten Werte verglichen mit denen, die mit der oft gebrauchten Formel berechnet wurden ($\mu = 10\,750$). Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle verzeichnet:

Einfluß der Temperatur auf die Verdauung von Thymolgelatine durch Pepsin.

Temp.	% beob.	% ber.
20	0,36	0,36
25	0,45	0,48
29,8	0,62	0,65
36,8	1,00	0,96
40,9	1,20	1,21

Schon Segelcke und Storch[1]) hatten festgestellt, daß eine Lösung von Lab Milch in Zeiten, die der Konzentration der Lösung

[1] Segelcke und Storch, Ugeskrift for Landmaend 1870.

Digitized by Google

umgekehrt proportional sind, zum Gerinnen bringt. Soxhlet bestätigte dieses Ergebnis durch genauere Messungen. Auf Grund der Proportionalität, die Lablösungen verschiedener Herkunft zwischen ihrer verdauenden und Milch koagulierenden Kraft zeigen, schloß Pawlow, daß Lab wahrscheinlich identisch mit Pepsin ist. Hammarsten stimmte Pawlows Ansicht nicht bei, weil Pepsin angeblich die Schützsche Regel befolgte, was bei Lab nach Soxhlets Versuchen nicht der Fall ist. Dieser Widerspruch ist offenbar nicht reell und Sawjalow spricht sich deshalb dahin aus, daß alle Versuche günstig für Pawlows Ansicht sind.

Die Wirkung des Labs auf die Gerinnung der Milch wird in analoger Weise wie die Wirkung des Pepsins untersucht. Madsen setzt z. B. verschiedene Labmengen q zu einer bestimmten Menge Milch, stellt die Mischungen, die in Probierröhrchen enthalten sind, in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur, nimmt sie nach der Zeit t heraus, kühlt sie schnell ab, und prüft, welches die geringste Menge q ist, die zur Gerinnung genügt. Die Ergebnisse stimmen mit denen beim Pepsin ganz überein, wie die folgende Tabelle zeigt.

Koagulierende Kraft von Lab in verschiedener Konzentration gegen Milch bei 36,55°.

t (Min.)	q	q t	t (Min.)	q	q t
4	0,08	0,32	35	0,007	0,25
6	0,05	0,30	50	0,005	0,25
9	0,033	0,30	70	0,004	0,28
11	0,024	0,26	80	0,0032	0,26
12	0,019	0,23	100	0,0028	0,28
14	0,0175	0,25	120	0,0025	0,30
20	0,013	0,26	180	0,00185	0,33
25	0,01	0,25	240	0,0017	0,41
30	0,007	0,21			

Der Mittelwert von q t ist 0,28 (oder, wenn die beiden letzten Beobachtungen ausgelassen werden, 0,267). Die letzten Werte zeigen ein merkliches Anwachsen von q t, d. h. eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Zeit. Dies stimmt gut überein sowohl mit andren Kopenhagener Beobachtungsreihen, wie mit denen andrer Beobachter, und kann vielleicht einer Schwächung des Labs mit der Zeit zugeschrieben werden.

Der Einfluß der Temperatur auf die koagulierende Kraft des Labs ist von Fuld[1]) untersucht worden. Er fand folgende Werte der Koagulationszeit t für gleiche Labmengen.

[1]) Fuld, Hofmeisters Beiträge 2, 169 (1902).

Digitized by Google

Temp.	t (Sek.)	$\varkappa_{beob.}$	$\varkappa_{ber.}$	
25,05	54	185	185	
30	32	312	327	
35	17	588	574	$\mu = 20650$
40	10,2	980	980	
44	9	1111	1491	
50	14,7	680	2742	

Die Werte $\varkappa_{beob.}$ sind 10 000 geteilt durch t. Sie stimmen bis zur Temperatur von 40° recht gut mit den berechneten Werten überein. Von da ab hört die Übereinstimmung auf: offenbar deshalb, weil über 40° die Zersetzung des Labs so schnell vor sich geht, daß die Beobachtungen dadurch eine Störung erleiden. Daraus erklärt sich auch das Auftreten eines Optimums bei 44°; dieses Optimum kann daher nicht als reell angesehen werden. Der beobachtete Effekt beruht darauf, daß das μ der spontanen Zersetzung viele Male (hier 4,4 mal) größer ist, als das μ des Fermentationsprozesses. Ähnliche Bemerkungen gelten für viele Prozesse, wo Optimen auftreten (vgl. S. 35, 78, 92).

Reichel und Spiro[1]) geben einige interessante Zahlen über die Gerinnung der Milch, bei wechselnder Verdünnung und bei Zusatz verschiedener Mengen Calciumchlorid. Der Calciumchloridzusatz gab die durchsichtigsten Resultate. 8 ccm Milch wurden mit 1, 0,5 und 0,25 ccm Lablösung (R), mit verschiedenen Mengen einer Calciumchloridlösung und mit soviel Wasser gemischt, daß das ganze Volumen 10 ccm war. Die Verfasser geben folgende Werte:

$CaCl_2$ in ‰	Koagulationszeit t (Sek.)			Konstante = (p + 0,6) t		
p	1 ccm R	0,5 ccm R	0,25 ccm R	1 ccm R	0,5 ccm R	0,25 ccm R
0	95	48	24	57	28,8	14,4
0,05	88,6	45,6	23	57,6	29,6	15,0
0,1	79	41,6	22	55,3	29,1	15,4
0,2	66,4	36	19	53,1	28,8	15,2
0,5	48	26,4	14	52,8	29,0	15,4
1,0	30	18,2	10,6	48,0	29,1	17,0
2,0	17	11	6,8	44,2	28,6	17,7
5,0	10	7,4	5,4	56,0	41,4	30,2
10,0	13	9,2	6,2	137,8	97,5	65,7
20,0	22	15	8,6	453,2	309	177,2

Wie die Zahlen zeigen, ist das Produkt (p + 0,6) t nahezu konstant, solange p 2 ‰ nicht überschreitet. Diese Beziehung ist nahezu von derselben Art wie die, die zwischen Labmenge und Koagulations-

[1]) Reichel und Spiro, Hofmeisters Beiträge 7, 478 (1905).

Digitized by Google

zeit besteht. Wenn die Labmenge R eingeführt wird, so wird die vollständige Gleichung der Reaktionszeit $R\ (p + 0{,}6)\ t = \text{Konst.}$ Die Zahl 0,6, die zu p zugefügt werden muß, um einen konstanten Wert zu erhalten, kann als die Menge von Calciumionen aufgefaßt werden, die anwesend ist, wenn kein Calciumchlorid zugesetzt ist. (Wie die Verfasser bemerken, setzt diese Annahme voraus, daß nur etwa 15 % der in der Milch vorhandenen Calciumverbindungen ionisiert sind.) — Barium- und Magnesiumchloride haben einen ähnlichen Einfluß wie Calciumchlorid; das weniger ionisierte Magnesiumsulfat einen analogen, aber schwächeren.

In einer andren Versuchsreihe wurde die Konzentration des Kaseins variiert. Das Lösungsmittel, das zur Verdünnung diente, war von Kasein befreite Milch, d. h. Molke. Die Labmenge war immer die gleiche, 1 ccm einer bestimmten Lösung. Die experimentellen Werte sind:

Milch	Molke	Koagulationszeit beob.	Koagulationszeit ber.
0,2 ccm	8,8	110 Sek.	110 Sek.
0,4	8,6	70	64
0,6	8,4	50	49
0,8	8,2	42	42
1,0	8,0	39	37,4
1,25	7,75	33	33,8
1,5	7,5	31,2	31,5
1,75	7,25	29,6	29,9
2	7	28,6	28,6
2,5	6,5	27	26,8
3	6	26	25,7
4	5	24	23,2
5,5	3,5	23	23,0
8	1	22	21,8

Die berechneten Werte der Koagulationszeit t sind mittels der empirischen Formel gefunden:

$$t - 21{,}6 = 1{,}75\ \frac{10 - M}{M}$$

worin M die Milchmenge (in ccm) in der Lösung bezeichnet.

Sehr verwickelte Resultate erhält man bei Verdünnung mit 0,9 % Chlornatriumlösung, wie folgende Tabelle ergibt, in der M und R die ccm Milch und Lab bedeuten, die in 10 ccm der Lösung enthalten waren. (Das Lab enthielt Kalksalze.) Der Rest $(10 - M - R)$ ist die Menge der zugesetzten Salzlösung. Die Zahlen der Tabelle geben die Koagulationszeit in Sekunden.

Digitized by Google

	R =	2	1,5	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3
M = 1,25	ccm	3	4	9	12	14,5	19	33	50	107	810
3	„	4	6	10	11,5	14	18	24	32	45	78
8	„	8	9	11	12	14	16	19	23	29	42

Wenn R = 0,8 oder 0,9 ccm ist, so ist die Koagulationszeit unabhängig von der Verdünnung der Milch, bei niedrigerer Konzentration von R wächst die Zeit mit der Verdünnung, bei höherer Konzentration von R gilt das Gegenteil.

Nach der Ansicht Sawjalows ist die Gerinnung der Milch nur ein Spezialfall der Verdauung, bei dem eins der Produkte koaguliert wird. Dies stimmt sehr gut mit Versuchen bei niedriger Temperatur überein, die zuerst Morgenroth ausgeführt und die dann Fuld wiederholt hat. Sie bereiteten Mischungen von Milch und Lab und hielten sie bei niedriger Temperatur. Es trat keine Gerinnung ein, aber der Verdauungsprozeß ging von statten. Wenn diese Mischungen einige Zeitlang bei niedriger Temperatur gestanden hatten und dann auf 20° oder mehr erhitzt wurden, so koagulierten sie augenblicklich.

Wie wir schon gesehen haben, haben die bei der Verdauung erzeugten Albumosesalze einen äußerst starken, verzögernden Einfluß auf die Reaktion. Ebenso wirkt nach Sawjalow ein Peptonzusatz zu einer Mischung von Milch und Magenflüssigkeit in der Richtung, daß er die Koagulationszeit stark verlängert. Wenn z. B. zu einer Mischung von 1 ccm Magenflüssigkeit und 10 ccm Milch an Stelle von 4 ccm Wasser 4 ccm Peptonlösung (1 ccm war 5,5 mg HCl äquivalent) zugesetzt wurden, so wuchs die Koagulationszeit von 29,8 auf 791 Sekunden. Die Wirkung ging also auf ungefähr 4% zurück. Einen gleichartigen Einfluß hat die Peptonlösung auf die Geschwindigkeit der Reaktion von Pankreasflüssigkeit und von Papayotinlösung auf Milch.

Da die Peptone den Albumosen sehr nahe verwandt sind, scheint dies darauf hinzudeuten, daß die verdauende Wirkung des Pepsins von derselben Art ist, wie der koagulierende Einfluß von Lab, Pankreasflüssigkeit oder Papayotin, wie es Pawlow und Sawjalow annehmen.

Ein Stoff, der ähnlich wie Pepsin auf Thymolgelatine wirkt, ist Trypsin. Über die Wirkung verschiedener Mengen (von 0,0022 bis zu 0,3 ccm) bei 47,3° gibt die folgende Untersuchung von Madsen und Walbum Aufschluß. Hier wurde keine Säure zugesetzt, sondern nur q ccm Trypsinlösung, 2 ccm Thymolgelatine und (2 — q) ccm

Digitized by Google

1 prozentige Kochsalzlösung. Hier, wie in den oben behandelten Fällen, zeigte sich das Produkt aus Reaktionszeit und reagierender Menge als eine Konstante, wenn der Stand der Reaktion der gleiche ist. In der folgenden Tabelle bezeichnen die Zeichen t und q Zeit und Menge.

Verflüssigung von Thymolgelatine durch Trypsin bei 47,3 °.

q	t (Std.)	q t	q	t (Std.)	q t
0,3	0,16	0,048	0,0072	8	0,058
0,105	0,5	0,052	0,006	10	0,060
0,05	1	0,050	0,0037	16	0,059
0,027	2	0,054	0,0032	18	0,058
0,02	3	0,060	0,0027	20	0,054
0,015	4	0,060	0,0025	22	0,055
0,011	5	0,055	0,0022	24	0,053
0,009	6	0,054		Mittel	0,056

An einem andren Trypsinpräparat wurde der Einfluß der Temperatur verfolgt. Der reziproke Wert von q t kann als die Reaktionskonstante angesehen werden; folgende Werte wurden dafür gefunden ($\varkappa = \frac{1}{qt}$, $\mu = 10570$).

Einfluß der Temperatur auf die Verdauung von Gelatine durch Trypsin.

Temp.	22,6	24,75	29,2	36,5	39,8	44,96	50,2
$\varkappa_{beob.}$	4,18	4,44	5,72	9,01	10,89	14,52	18,35
$\varkappa_{ber.}$	4,04	4,60	5,98	9,06	10,85	14,30	18,74

In den meisten Beobachtungsreihen von Madsen und Walbum ist ein Anwachsen von q t mit der Zeit zu beobachten. Das mag durch Bindung von etwas Trypsin zu erklären sein, oder durch allmähliche Schwächung. μ ist nahezu dasselbe wie für Pepsin.

Bayliss[1]) untersuchte nach Sjöqvists Methode den Verlauf der Einwirkung von Trypsin auf Kasein. Eine 8 prozentige Lösung des Natriumsalzes des Kaseins wurde dargestellt und zu 6 ccm dieser Lösung wurden 2 ccm 0,5- normales Ammoniak und 2 ccm einer 2 prozentigen Trypsinlösung gesetzt. Die Leitfähigkeit wurde bei 39° zu verschiedenen Zeiten gemessen und ihre Zunahme in einer Kurve aufgezeichnet. Diese Kurve strebt einer oberen Grenze zu. Indem ich die Ordinaten y dieser Kurve in mm ausmaß, fand ich folgende Werte:

[1]) Bayliss, Archives des sciences biologiques 11, Suppl. p. 261, Petersburg 1904.

Digitized by Google

Verlauf der Verdauung von Kasein durch Trypsin bei 39°

t (Std.)	y beob.	y ber.
0,3	25,0	29,0
0,5	35,5	35,7
0,7	41,0	40,8
1	48,0	46,4
1,5	55,5	53,7
2	59,2	58,4
2,5	62,2	61,4
3	64,6	64,2
3,5	66,0	66,4
4	67,5	68,1
5	70,0	70,8
6	71,4	72,6
7	72,7	73,3
8	74,2	74,8
∞	(77,0)	—

Verlauf der Verdauung von Eiweiß durch Trypsin bei 39°

t (Std.)	y beob.	y ber.
1	10,2	10,2
2	15,0	13,8
4	18,8	18,5
6	22,0	22,0
8	24,0	24,1
10	25,5	26,5
15	29,2	30,3
20	31,8	33,2
25	33,6	35,3
30	35,4	36,9
40	38	39,4
50	41	41
∞	45	—

Die berechneten Werte sind mit Hilfe derselben Formel gefunden, die für die Pepsinwirkung benutzt wurde; $\varkappa$ P ist gleich 320 gesetzt. Sie schließen sich eng an die beobachteten an. Dasselbe gilt für eine Lösung von Eiweiß, die zuvor auf 100° erhitzt worden war, um ihren Gehalt an Antitrypsin zu zerstören. Die Lösung enthielt 10 ccm einer Mischung von 10% Eiweiß und 90% destilliertem Wasser, und 1 ccm einer 1 prozentigen Trypsinlösung. Hier ist $\varkappa P = 30$. Die Reaktion auf Kasein wächst zwischen 20,7° und 30,7° im Verhältnis 1:5,3 ($\mu = 29500$) und zwischen 30,7 und 38,7 wie 1:2,6; die Bestimmungen sind nicht sehr zuverlässig; wahrscheinlich besteht ein Optimum, das von der Unbeständigkeit des Trypsins bei höherer Temperatur herrührt.

Hier beruht die Vermehrung der Leitfähigkeit wahrscheinlich auf der Bildung von Ammoniaksalzen der Reaktionsprodukte. Diese reagieren auch mit dem Trypsin, so daß die freie Trypsinmenge der Menge der Reaktionsprodukte nahezu umgekehrt proportional ist, wodurch die Reaktion in der ersten Periode proportional mit der Quadratwurzel aus der Zeit fortschreitet. Bayliss zeigte, daß Zusatz von Verdauungsprodukten, sowie von Asparagin, Glyzin (Merck), Leucin und Amphopepton (Grübler), die Wirkung des Trypsins in hohem Grade verzögert.

Henri und Larguier des Bancels[1]) haben die Methode Sjöqvists benutzt, um die Verdauung mittels Pankreassaft zu studieren. Sie sagen, daß dieser tryptische Verdauungsvorgang das Gesetz der monomolekularen Reaktion befolgt und geben als Beispiel folgende

[1]) Victor Henri und Larguier des Bancels, C. R. de la Soc. de Biol. **55**, 787, 789, 866 (1903).

Digitized by Google

Zahlen für die zeitliche Veränderung der Leitfähigkeit (bei 44,3°, 4 prozentige Gelatinelösung).

t (Min.)	Änderung der Leitfähigkeit			Mittel	$7{,}37\sqrt{t}$
10	27	28	27	27,3	29,3
20	46	44	42	44	41,5
30	53	55	51	53	50
40	58	60	58	58,7	58,7
55	66	66	65	65,7	68,8

Da der Endwert nicht beobachtet ist, so können wir nur schließen, daß die Änderung der Leitfähigkeit sehr nahe proportional mit der Quadratwurzel aus der Verdauungszeit verläuft, wie aus der letzten Kolumne hervorgeht. Es darf daher als wahrscheinlich betrachtet werden, daß diese Versuche nicht im Gegensatz zu denen andrer Beobachter stehen, die fanden, daß die Regel von Schütz während der ersten Zeit der Verdauung erfüllt ist.

Dieselben Autoren haben auch Kasein, aufgelöst in einer 2 prozentigen Natriumkarbonatlösung, auf dieselbe Weise verdaut. Sie fanden folgende Änderungen der Leitfähigkeit (bei 44°):

t	Änderung	$7{,}59\sqrt{t}$
10	24	24
20	36	34
30	41	42
40	42	48
50	44	54

Während der ersten Zeit (30 Min.) ist die Änderung nahezu proportional der Quadratwurzel aus der Zeit.

Eine andre Versuchsreihe betrifft das Problem der Verdauung verschiedener Mengen Gelatine oder Kasein oder beider zugleich, mittels einer konstanten Trypsinmenge. Die Beobachtungen folgen hier zusammen mit einigen berechneten Zahlen.

t	G 3,5%		G 1,75%		K 2,5%		K 1,25%	
	beob.	ber.	beob.	ber.	beob.	ber.	beob.	ber.
10	17	18	11	13	23	26	20	18
20	30	25	18	18	39	37	26	26
30	37	29	20	22	46	45	28	32

t	G 3,5% + K 2,5%		G 3,5% + K 1,25%		G 1,75% + K 2,5%		G 1,75% + K 1,25%	
	beob.	ber.	beob.	ber.	beob.	ber.	beob.	ber.
10	25	32	28	24	25	29	28	22
20	50	45	45	34	47	41	42	32
30	63	55	55	41	58	50	47	39

Die berechneten Werte sind mit Hilfe der Annahme bestimmt, daß die verdaute Menge der Gelatine proportional $3{,}05\sqrt{ct}$ ist, und

Digitized by Google

die des Kasein proportional $5{,}2\sqrt{ct}$, wobei c die Konzentration in % und t die Zeit in Minuten ist. (In der Tabelle bedeuten G Gelatine und K Kasein.) Übereinstimmung scheint innerhalb der Versuchsfehler vorhanden zu sein, und wir dürfen wohl schließen, daß die verdaute Menge, für kurze Zeiten, proportional der Quadratwurzel der Konzentration sowohl wie der Zeit ist. Die für die Mischungen berechneten Werte sind unter der Vorraussetzung gefunden, daß 1% Kasein und 2,9% Gelatine $\left(2{,}9 = \left[\frac{5{,}2}{3{,}05}\right]^2\right)$ sozusagen äquivalent sind. Daher sind 3,5% Gelatine + 2,5% Kasein äquivalent mit $3{,}5 + 7{,}3 = 10{,}8$% Gelatine. Die beobachtete Wirkung ist bei den Mischungen im allgemeinen größer als die berechnete, nur für die kürzeste Zeit sind sie nahezu gleich, es dürfte daher die Regel, die dieser Rechnung zugrunde liegt, grade für kurze Zeiten recht gut der Wirklichkeit entsprechen. Eine genauere Prüfung wird erst möglich, wenn der Endwert der Leitfähigkeitsänderung bekannt ist und auch die Beobachtungen verbessert und vervielfältigt sind.

Die besprochne Rechnung ist auf die Annahme gegründet, daß die Verdauungsprodukte des Kaseins denselben bindenden Einfluß auf die Reagenzien (wahrscheinlich das Trypsin) ausüben, wie die entsprechenden Derivate der Gelatine, wenn sie dieselbe Änderung der Leitfähigkeit hervorbringen. Das ist natürlich nicht notwendigerweise der Fall; es ist bloß die einfachste Hypothese, die wir, bei dem gegenwärtigen unentwickelten Stande der Untersuchungen, über diesen Punkt einführen können. Daher ist es durchaus nicht notwendig, mit Henri und Larguier anzunehmen, daß das Trypsin vom Kasein und von der Gelatine gebunden wird, um zu erklären, daß die beobachtete Wirkung bei der gleichzeitigen Verdauung von Gelatine und Kasein kleiner ist, als die Summe der Wirkungen bei der Verdauung der beiden Substanzen jede für sich. Eine solche Hypothese ließe sich wohl begründen, wenn wir die Verdauung in einem so frühen Stadium beobachten könnten, daß die verdaute Menge der Zeit proportional wäre oder, mit andren Worten, daß die Verdauungsprodukte an Menge (in Äquivalenten gerechnet) weit hinter der Trypsinmenge zurückstünden. Aber diese Bedingung ist weder bei den besprochenen noch irgend welchen andren Versuchen erfüllt.

In derselben Art führten Henri und Lalou[1]) einige Messungen über die Zersetzung des Amygdalins und Salicins mittels Emulsins bei 26° aus. Die Werte sind mit Hilfe des Polarimeters bestimmt. Folgendes Beispiel sei gegeben:

[1]) Henri und Lalou, C. r. de la Soc. de Biol. 55, 868 (1903).

Digitized by Google

t (Min.)	Salicin 2%	Amygdalin 2,5%	Salicin 2% u. Amygdalin 2,5%	Salicin 4%	Amygdalin 1,25%
46	0,67	0,97	1,05	1,08	0,90
130	1,58	2,38	3,63	2,25	1,57
268	2,32	3,15	4,22	3,45	1,56
∞	3,15	3,17	6,32	6,30	1,59

Die Zersetzung der Mischung ist viel langsamer als die Summe der Zersetzungen der Bestandteile. Zum Vergleich sind die Zahlen für die Zersetzung von 4% Salizin und 1,25% Amygdalin unter ähnlichen Bedingungen daneben gesetzt. Die Erklärung dieses Unterschiedes ist offenbar dieselbe, wie die der Nichtproportionalität von Wirkung und Konzentration und gibt keinen strikteren Beweis für die Vereinigung von Enzym und Substrate, wie diese.

Über die Verdauung von Weizenprotein mittels Malzextrakt (der Trypsin und Pepsin enthält) hat Weis[1]) viele Versuche ausgeführt.

Großes Interesse verdienen die Versuche, bei denen die Proteinmenge geändert wurde. In den oben angeführten Versuchsreihen ist nämlich die Menge des zu verdauenden Eiweißkörpers konstant gehalten. Die Proteinmenge ist unten unter n in Prozent der Versuchsflüssigkeit angegeben. Danach steht die in 2 bzw. 5 Stunden verdaute Menge in Prozent der ursprünglichen Proteinmenge. Diese verdaute Menge sinkt mit steigendem n (ihr absoluter Wert steigt aber). Dies beruht darauf, daß wenn beispielsweise 10% der Proteinmenge verdaut sind, die absolute Menge der Reaktionsprodukte doppelt so groß ist, wenn $n = 2$, wie wenn $n = 1$. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist aber der absoluten Menge der Reaktionsprodukte, also in diesem Fall auch dem Wert von n umgekehrt proportional. Dies verursacht, daß die umgesetzte Menge, in Prozent der totalen Proteinmenge ausgedrückt, nahezu der Quadratwurzel aus n umgekehrt proportional ist, wenn man sie mittelst der Formel auf S. 44 berechnet, wie folgende Daten zeigen.

	Verdaute Menge nach				
	2 Stunden		5 Stunden		
n	beob.	ber.	beob.	ber.	
1%	22,0	21,4	36,2	32,4	$x = \frac{13{,}5\ t}{n}$
2	17,0	15,6	25,9	23,8	
3	13,1	12,9	20,3	19,8	
4	9,1	11,2	16,0	17,3	
5	7,9	10,0	13,2	15,6	

Die Übereinstimmung erscheint, in Anbetracht der recht komplizierten Zusammensetzung des Substrates, befriedigend.

In allen Fällen der Verdauung und der Lipolyse, die der S. 44

[1]) Fr. Weis, Meddelelser fra Carlsberg-Laboratoriet 5, 127 (1903).

Digitized by Google

gegebenen Formel, d. h. der Schützschen Regel, unterworfen sind, spielt, solange der Prozeß noch nicht zu weit fortgeschritten ist, die Konzentration des Substrats dieselbe Rolle wie die des Enzyms, und wie die Zeit, was auch aus theoretischen Gründen zu erwarten ist.

Die Produkte einer Kultur des Bacillus pyacyaneus haben einen verflüssigenden Einfluß auf Thymolgelatine, genau wie Pepsin und Trypsin. Auch dieser Vorgang wurde von Madsen und Walbum verfolgt. Es wurde gefunden, ebenso wie beim Pepsin und Trypsin, daß die Zeit, in der die Gelatine bis zu einem bestimmten Grade verflüssigt wird, der Menge wirksamen Stoffes umgekehrt proportional ist. Die Bouillon, in der der Bacillus pyocyaneus 2 Wochen lang gezüchtet worden war, wurde durch ein Chamberlandfilter filtriert und so von den Bazillen getrennt. Eine bestimmte Menge (q ccm) wurde zu 2 ccm 7 prozentiger Thymolgelatine und (2 — q) ccm 1 prozentiger NaCl-Lösung gefügt. Die Versuchstemperatur war 34,5°.

Verdauung von Thymolgelatine mittels Pyocyaneus-Kultur.

q	t (Std.)	q t	q	t (Std.)	q t
1,6	0,5	0,8	0,11	8	0,88
0,8	1	0,8	0,09	10	0,90
0,46	2	0,92	0,08	12	0,96
0,3	3	0,9	0,06	16,5	0,99
0,22	4	0,88	0,044	18	0,79
0,2	4,5	0,9	0,042	20	0,84
0,17	6	1,02	0,035	25	0,88
				Mittel	0,89

Madsen und Walbum haben die Zerstörung von Coli-Agglutinin durch Trypsin bei 35,6° untersucht. Die Stärke des Agglutinins wurde mit Hilfe seiner Agglutinationskraft bestimmt, die beobachtete Menge q ist diejenige Agglutininmenge, die einer Emulsion von Bacillus Coli zugesetzt werden muß, um in gegebener Zeit eine gegebene Agglutination hervorzubringen. Die Werte sind in folgender Tabelle zusammengestellt. Die Stärke s ist der reziproke Wert von q. Die Reaktion ist eigentümlich genug, bimolekular; $100000\ \varkappa = 68$.

Zerstörung von 1 ccm Coli-Agglutininlösung durch 5 ccm einer 4 prozentigen Trypsinlösung bei 35°.

t (Std.)	s beob.	s ber.	t (Std.)	s beob.	s ber.
0	1000	1000	6	189	197
0,5	775	763	8	149	155
1	610	600	10	140	128
2,25	389	395	12	108	101
3	280	329	14	88	95
4,17	259	261	23	61	57
5	233	227	25	59	56

Digitized by Google

Die Übereinstimmung ist in Anbetracht der ziemlichen großen Beobachtungsfehler sehr befriedigend. Hier liegt eine direkte Bestimmung der Zersetzung vor, und nicht nur eine indirekte, wie in der Messung der elektrischen Leitfähigkeit.

Die Zersetzung des Labs nimmt sehr rasch mit steigender Temperatur zu, wie folgende Tabelle zeigt:

Schwächung von Lab in 2prozentiger Lösung bei 47,55 °.

t (Min.)	Stärke beob.	Stärke ber.
0	20	17,9
2,5	14,3	14,3
5	10,5	11,4
7,5	8,3	9,1
10	7,1	7,1
12,5	5,9	5,9
15	5,0	4,8
17,5	4,0	3,7
20	3,0	3,0
22,5	2,2	2,4
25	1,8	1,9
	$\varkappa = 0{,}0386$	

Schwächung von Lab in 2prozentiger Lösung bei verschiedenen Teperaturen.

Temp.	$\varkappa$ beob.	$\varkappa$ ber.
44,51	0,0127	0,011
46,04	0,0231	0,022
47,55	0,039	0,0414
48,57	0,0646	0,0647
49,12	0,072	0,0836
49,6	0,101	0,102
	$\mu = 89\,130$	

Die Reaktion ist monomolekular. Der Einfluß der Temperatur ist durch einen ziemlich hohen Wert von μ charakterisiert. Eine zweite Reihe ergab $\mu = 91\,000$, so daß im Mittel $\mu = 90\,000$.

Die Schwächung ist bei kleinen Konzentrationen viel ausgesprochener als in größeren, wie folgende, für 46 ° gültige Zahlen zeigen:

Konzentration	7	6	5	4	3	2
Zerfallgeschwindigkeit $\varkappa$	0,00372	0,003	0,0049	0,0077	0,0154	0,0212

Konzentration	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Zerfallgeschwindigkeit $\varkappa$	0,028	0,032	0,039	0,060	0,073

Trocknes Labpulver ist gegen Temperatur sehr widerstandsfähig, es gab $\varkappa = 0{,}0414$ bei 158 °. Die Reaktion war monomolekular.

Die Zerstörung des Labs wird in hohem Grade beschleunigt, wenn eine Base zugegen ist. Madsen fügte zu 200 ccm einer 10prozentigen Lablösung verschiedene Mengen von 1 n NaOH. Er fand daß der Zerfall langsamer fortschreitet als nach der Formel für eine monomolekulare Reaktion. Dies beruht ohne Zweifel auf einem verzögernden Einfluß der Reaktionsprodukte. Dieser Einfluß kann in dem folgenden Beispiel, in welchem 3 ccm 1 n NaOH auf 200 ccm Lablösung bei 46 ° einwirken, mit genügender Genauigkeit der dritten

Digitized by Google

Wurzel aus der noch übrigen Labmenge proportional gesetzt werden, wie die Übereinstimmung der beobachteten mit den so berechneten Werten zeigt:

$q_{beob.}$ bezeichnet die Menge Lab, die nötig ist, um Gerinnung in 10 Minuten hervorzurufen, $q_{ber.}$ ist die entsprechende berechnete Menge.

Zerfall des Labs in Gegenwart von Natriumhydroxyd bei 46°.

t (Min.)	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$	t (Min.)	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$
0	0,040	0,040	10	0,50	0,48
2	0,073	0,079	12	0,70	0,66
4	0,130	0,139	14	1,00	0,88
6	0,20	0,22	16	1,15	1,15
8	0,35	0,33			

Die berechneten Werte gehorchen der Formel:

$$q_1^{1/6} - q_0^{1/6} = 0{,}044\ (t_1 - t_0).$$

Madsen hat auch die Zersetzung von Trypsin durch Natronlauge untersucht und hat für dieses Enzym ähnliches gefunden. Die sehr umfassenden Messungen sind gerade einer Berechnung unterworfen, deren Resultate noch nicht endgültig festgestellt sind.

Die Geschwindigkeit dieser beiden Reaktionen scheint mit der Temperatur zuzunehmen in ungefähr demselben Verhältnis wie die Zersetzung von Coli-Agglutinin durch Trypsin (vgl. S. 59).

Was die freiwillige Schwächung des Pepsins betrifft, so fanden Madsen und Walbum, daß die Reaktion monomolekular ist, wie folgende Tabelle zeigt. Die Zunahme dieser Reaktion mit der Temperatur gibt $\mu = 75\,600$, das ist $^5/_6$ des Wertes für Lab (2prozentige Lösung). Da die Herstellungsart nicht identisch war und die Präparate auch in verschiedenen Konzentrationen angewandt wurden, so gibt dieser Unterschied keine Aufklärung über die mögliche Identität von Lab und Pepsin (vgl. Kap. IX). Die Stärke des Pepsins wurde durch seine verdauende Wirkung auf Thymolgelatine gemessen (s. S. 46).

Schwächung des Pepsins (5prozentige Lösung) bei 66,8°

t (Min.)	Stärke $_{beob.}$	Stärke $_{ber.}$
0	17,5	17,6
5	11,1	12,8
10	8,33	8,71
20	4,35	4,34
30	2,22	2,15
40	1,11	1,06

$x = 0{,}0305$

Schwächung des Pepsins bei verschiedenen Temperaturen

Temp.	x beob.	x ber.
57	0,00112	0,00112
60	0,0047	0,0036
63,3	0,0109	0,0098
64,8	0,0141	0,0160
66,8	0,0305	0,0305

$\mu = 75\,600$

Trypsin verhält sich ganz ähnlich wie Lab und Pepsin. Die Reaktion seines freiwilligen Zerfalls ist monomolekular und die Ge-

Digitized by Google

schwindigkeitskonstante der Reaktion wächst sehr schnell mit der Temperatur ($\mu = 62\,000$). Die Werte sind:

Zerfall von Trypsin bei 64,03 °

t (Min.)	Stärke beob.	Stärke ber.
0	12,5	12,1
5	11,8	11,6
11	11,1	11,1
15	10,5	10,8
20	10,0	10,4
30	9,1	9,6
40	8,7	9,0
50	8,3	8,3
60	7,7	7,7
80	6,7	6,7
100	5,9	5,9
120	5,6	5,0

$\varkappa = 0{,}00317$

Zerfall von Trypsin bei verschiedenen Temperaturen

Temp.	$\varkappa$ beob.	$\varkappa$ ber.
60,72	0,00127	0,00127
61,95	0,0018	0,0018
63,00	0,0024	0,0024
64,03	0,0032	0,0032
67,15	0,0073	0,0074
72,15	0,0274	0,0274
74,35	0,049	0,049

$\mu = 62\,034$

Die Konzentration der Trypsinlösung hat hier keinen merklichen Einfluß auf die Zersetzungsgeschwindigkeit, Lösungen mit einem Gehalt von 2, 4, 6, 8 und 10prozentigem Trypsin gaben alle befriedigende Resultate, wenn sie mit dem Werte $\varkappa = 0{,}0073$ (bei 67,15 °) berechnet wurden. Die Stärke des Trypsins wurde durch sein Vermögen, Thymolgelatine zu verdauen, gemessen.

Trypsin hat, wie wir gesehen haben, einen zerstörenden Einfluß auf Coli-Agglutinin, und diese Zerstörung geht bei höherer Temperatur schneller vor sich als bei niederer, wie aus folgenden Messungen von Madsen und Walbum ersichtlich ist. Bei 44,2 ° unterscheiden sich die berechneten Werte für lange Zeiten ziemlich stark von den beobachteten, vermutlich infolge des freiwilligen Zerfalls des Trypsins.

Zerstörung von Coli-Agglutinin (1 ccm) durch Trypsin (q cc 1prozentige Lösung) bei verschiedenen Temperaturen. $\mu = 14\,200$.

	bei 33,5 °			bei 37,2 °			bei 44,2 °		
		Stärke			Stärke			Stärke	
t (Std.)	q beob.	beob.	ber.	q beob.	beob.	ber.	q beob.	beob.	ber.
0	0,001	1000	1000	0,001	1000	1000	0,001	1000	1000
1,25	0,0017	589	602	0,002	500	515	0,0025	400	407
3	0,0023	435	386	0,0027	370	308	0,005	200	222
5	0,0038	263	274	0,0047	213	211	0,008	125	146
8	0,005	200	191	0,008	125	141	0,0095	105	96
12	0,008	125	136	0,01	100	100	0,0115	87	66
	$10^5 \varkappa = 53$			$10^5 \varkappa = 75$ (ber. 70)			$10^5 \varkappa = 117$		

Digitized by Google

Die Methode, die benutzt wurde, um die Stärke zu messen, ist die von Madsen und Jörgensen[1]) beschriebene: die Menge $q_{beob.}$, die zur Erzeugung eines bestimmten Grades der Agglutination erforderlich war, wurde bestimmt, ihr reziproker Wert ist die Stärke. Aus den Beobachtungen sind die Werte x berechnet, mit deren Hilfe die berechneten Werte der Stärke abgeleitet sind. Die Übereinstimmung der nach der Formel berechneten mit den beobachteten Werten ist befriedigend. Aus den zwei Werten bei 33,5° und 44,2° ist der Wert $\mu = 14200$ mit Hilfe der allgemeinen Formel berechnet. Mit diesem Werte von μ finden wir $10^5 x = 70$ bei 37,2° in genügender Übereinstimmung mit dem beobachteten Werte 75.

Eine eigentümliche Gesetzmäßigkeit ist für die koagulierende Wirkung des Fibrinferments auf Plasma gefunden. Hier ist nicht, wie bei der Milchgerinnung durch Lab, das Produkt aus Reaktionszeit und Konzentration nahezu konstant, sondern das Produkt aus Konzentration zur $^2/_3$ten und Reaktionszeit gibt einen nahezu konstanten Wert, wie durch folgende Zahlen, die von Madsen und Walbum, sowie von Fuld[2]) gefunden sind, bewiesen wird.

Plasma aus Pferdeblut (Madsen und Walbum)			Plasma von der Gans (2 ccm) mit C ccm Extrakt aus Gansmuskel (Fuld)		
t (Min.)	C	t (10 C)$^{2/3}$	t (Sek.)	C	t (10 C)$^{2/3}$
105	0,6	330	80	0,2	127
155	0,3	322	120	0,1	120
230	0,15	301	180	0,05	113
328	0,10	328	290	0,025	115
595	0,05	375			

Die Reaktion verläuft also nicht proportional der Konzentration des Fibrinogens, sondern proportional ihrer Potenz $^2/_3$. Nähere Untersuchungen scheinen wünschenswert.

Auch der Prozeß der Präzipitation ist demselben Temperatureinfluß unterworfen, wie die andren studierten Prozesse.[3]) Die präzipitierenden Stoffe waren 10n Schwefelsäure und Albuminpräzipitin, hergestellt durch subkutane Injektion von Eialbumin in ein Kaninchen. Folgende Werte wurden an einer Lösung von 2 ccm Eialbumin in 98 ccm physiologischer Salzlösung beobachtet:

---

[1]) Festskrift ved Indvielsen af Statens Serum Institut, Kopenhagen 1902, Nr. 5.

[2]) Fuld, Hofmeisters Beiträge 2, 514, 1902.

[3]) Madsen und Walbum, Oversigt over det kgl. danske Vid.-selsks. Forh. 1904, S. 441.

Digitized by Google

10n H_2SO_4 (90 Min.)			Präzipitin (73 Min.)		
Temp.	q beob.	q ber.	Temp.	q beob.	q ber.
35,8	0,10	0,11	36,1	0,25	0,25
29,7	0,16	0,16	30,1	0,30	0,31
25,4	0,22	0,21	20,0	0,45	0,44
19,9	0,30	0,29	13,9	0,55	0,55
14,5	0,40	0,41		$\mu = 6300$	
	$\mu = 11000$				

Die beiden Prozesse sind zweifellos von sehr verschiedener Natur. Hier ist vorausgesetzt, daß die Präzipitine, ebenso wie Lab, dem Gesetze gehorchen, daß das Produkt aus Zeit und aktiver Masse konstant ist. Wenn also z. B. 0,1 ccm 10n H_2SO_4, wirkend auf 8 ccm der Eialbuminlösung, sie bei 35,8° in 90 Minuten koaguliert, so nehmen wir an, daß 0,3 ccm dieser Säure in 30 Minuten Koagulation hervorbringen würden. Nun koaguliert diese Menge die Eiweißlösung bei 19,9° in 90 Minuten. Wir sagen daher, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei 35,8° dreimal größer als bei 19,9° ist. Auf diese Weise kann die Variation der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Temperatur berechnet werden und hieraus der Wert von μ. Analog beobachten wir beim Präzipitin die Menge, die erforderlich ist, um in gegebener Zeit die gleiche Menge Präzipitat zu geben und berechnen daraus die verschiedenen Zeiten, in denen, bei verschiedenen Temperaturen, dieselbe Präzipitinmenge denselben Präzipitationsgrad geben würde. Wahrscheinlich würde eine nähere Untersuchung zeigen, daß die Grundlage der Rechnung richtig ist.

Ein interessanter Fall einer bimolekularen Reaktion ist von Madsen und Walbum[1]) in der gegenseitigen Einwirkung zwischen Tetanolysin und Pepton aufgefunden worden. Es wurde eine Lösung von 2 g Witte-Pepton in 100 ccm Wasser und eine zweite von 2% Tetanolysin in physiologischer Salzlösung dargestellt. 4 ccm der Lysinlösung, je 0,15, 0,20 und 0,25 ccm der Peptonlösung, und so viel physiologische Salzlösung, daß das Ganze 8 ccm füllte, alles erwärmt auf 36,1°, wurden gemischt, die Mischungen in ein Wasserbad von derselben Temperatur gebracht und ihre hämolytische Kraft zu verschiedenen Zeiten bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde ein Teil der betreffenden Mischung schnell abgekühlt, indem er in ein von Eis umgebenes Reagenzrohr gebracht wurde. Dadurch kam die Zersetzung des Lysins praktisch zum Stillstand. Die noch vorhandene Lysinmenge wurde auf die gewöhnliche Weise bestimmt, indem eine

[1]) Madsen und Walbum, Zentralblatt f. Bakteriologie, 27, (1905).

Digitized by Google

kleine Menge davon zur Hämolyse einer Erythrocytenemulsion benutzt wurde.

Auf diese Weise wurden folgende Werte beobachtet:

t (Std.)	Toxität q beob.	q ber.	$\frac{1}{q}$ beob.	$\frac{1}{q}$ ber.
	0,15 ccm Pepton zugesetzt.			
0	100	(55,8)	0,01	(0,0179)
0,5	47,7	47,7	0,021	0,0210
1	39,7	41,4	0,0252	0,0241
2	30,3	33,0	0,0330	0,0303
4	22,3	23,4	0,0448	0,0427
6	18,1	18,1	0,0552	0,0551
8	17,0	14,8	0,0588	0,0675
	0,20 ccm Pepton zugesetzt.			
0	100	(60,0)	0,01	(0,0167)
0,5	41,6	41,6	0,024	0,024
1	30,3	31,5	0,033	0,0313
2	20,0	21,5	0,050	0,0460
4	12,2	13,5	0,082	0,0754
6	9,6	9,7	0,105	0,1048
8	8,0	7,5	0,125	0,1342
	0,25 ccm Pepton zugesetzt.			
0	100	(70,0)	0,01	0,0142
0,5	35,2	35,2	0,0284	0,0284
1	22,0	23,4	0,0455	0,0426
2	13,0	14,0	0,0769	0,0711
4	6,0	7,8	0,1667	0,128
6	5,3	5,4	0,1886	0,185
8	3,8	4,1	0,2631	0,242

Offenbar folgt die Reaktion sehr annähernd den Gesetzen der bimolekularen Reaktion hinsichtlich der Menge q freien Toxins, so daß:

$$-\frac{dq}{dt} = \varkappa q^2$$

und:

$$\frac{1}{q_2} - \frac{1}{q_1} = \varkappa (t_2 - t_1).$$

Die beobachteten und berechneten Werte stimmen innerhalb der Beobachtungsfehler überein. Eine Ausnahme macht offenbar der erste Wert ($t = 0$). Ebenso wie bei ähnlichen chemischen Prozessen, ist es schwierig, die Zeit 0 zu bestimmen, da die Reaktion nicht augenblicklich still steht, wenn die Mischung aus dem Wasserbad genommen ist. Wir benutzen daher dieselbe Methode, die früher bei

Digitized by Google

ähnlichen Untersuchungen angewendet worden ist, nämlich die Zeit von der ersten experimentellen Bestimmung der Toxicität an zu zählen, die ausgeführt wurde, wenn die Mischung eine halbe Stunde bei 36,1° gestanden hatte.

Die Konstante $\varkappa$ wächst sehr rasch mit dem Gehalt der Lösung an Pepton, wie folgende Tabelle zeigt:

Konzentration des Peptons C	0,15	0,20	0,25
Konstante $\varkappa_{beob.}$	0,0062	0,0147	0,0285
„ $\varkappa_{ber.} = 1{,}833 \cdot C^3$	0,0062	0,0147	0,0286

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional mit q^2C^3, was mit der Annahme erklärt werden kann, daß sich zunächst eine Verbindung von 2 Tetanolysin- und 3 Peptonmolekülen bildet, die sich sehr schnell, unter Zerstörung des Tetanolysins, zersetzt.

Auch für diesen Prozeß haben Madsen und Walbum den Einfluß der Temperatur untersucht, der hier besonders klein ist, indem μ nur gleich 10200 gefunden wurde. Zum Vergleich mag angeführt werden, daß bei der Verseifung des Äthylacetats μ einen Wert von derselben Größenordnung, nämlich 11160, besitzt. Sie prüften die Reaktionsgeschwindigkeit an einer Lösung, die 4 ccm der Tetanolysinlösung, 0,08 ccm einer 2 prozentigen Lösung von Wittes Pepton und 3,9 ccm physiologische Salzlösung enthielt, bei 37,1°, 31,2°, 27,5° und 17,8°. Sie fanden folgende Zahlen:

Einfluß der Temperatur auf die Zersetzung von Tetanolysin durch Pepton.

	Bei 37,1°			Bei 31,2°	
t (Std.)	q beob.	q ber.	t (Std.)	q beob.	q ber.
0	100	100	0	100	100
0,33	41,5	41,7	0,33	46,7	48,8
1	18,8	18,9	1	26,3	24,2
2	12,1	10,4	2	13,2	13,8
	Bei 27,5°			Bei 17,8°	
0	100	100	0	100	100
0,33	48,9	54,9	0,33	69,8	69
1	28,3	28,2	1	46,1	40,8
2	16,7	16,4	2	21,5	25,7
4	9,5	8,9	4	13	14,8

Die Übereinstimmung zwischen den beobachteten und berechneten Werten ist überraschend, selbst bei 17,8°, wo die Abweichungen am größten sind, liegen sie innerhalb der möglichen Beobachtungsfehler.

Die nach der bimolekularen Formel berechneten Reaktionskonstanten $\varkappa$ sind in der folgenden Tabelle ($\mu = 10240$) gegeben.

Digitized by Google

Temp.	× beob.	× ber.
37,1	0,0431	0,0431
31,2	0,0313	0,0313
27,5	0,0255	0,0255
17,8	0,0144	0,0144

Hier ist die Übereinstimmung nahezu absolut. Bei den oben besprochenen Reaktionen, bei denen das Temperaturintervall nur 4^0 betrug, hätte einer einfache Exponentialformel ebensogute Resultate wie die aus der physikalischen Chemie übernommene, kompliziertere, gegeben; hier dagegen ist das Temperaturintervall so groß, daß die gewöhnliche Exponentialformel deutlich eine schlechtere Übereinstimmung mit den Beobachtungen ergeben hätte. Immerhin hätten die Abweichungen die Versuchsfehler noch nicht überschritten.

Es mag bemerkt werden, daß nicht alle Peptone diesen abschwächenden Einfluß auf Tetanolysin haben, z. B. ist Chapeautauds Pepton ohne Einfluß.

Als allgemeines Ergebnis dieser Untersuchungen finden wir, daß die freiwillige Zersetzung der studierten Substanzen in Lösung sehr rasch mit der Temperatur wächst. Die Zerstörung dieser Substanzen durch katalytische Agenzien steigt meistens viel langsamer, und zwar etwa im selben Maße wie bei den katalytischen Prozessen, die aus der allgemeinen Chemie bekannt sind.

Die beobachteten Werte von μ sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Freiw. Zers. von trocknem Emulsin	$\mu =$	26300	(Tammann)
„ „ „ Emulsin in 0,5proz. Lösung	$\mu =$	45000	(Tammann)
„ „ „ Trypsin in 2proz. Lösung	$\mu =$	62034	
„ „ „ Pepsin in 2proz. Lösung	$\mu =$	75600	
„ „ „ Lab in 2proz. Lösung	$\mu =$	90000	
„ „ „ Vibriolysin in Lösung	$\mu =$	128000	
„ „ „ Tetanolysin in Lösung	$\mu =$	162000	
„ „ „ Hämolysin in Lösung	$\mu =$	198500	
„ „ „ Dibrombernsteinsäure	$\mu =$	22220	(van't Hoff)
Zersetzung von Salicin durch Emulsin	$\mu =$	3300	?(Tammann)
„ „ Rohrzucker durch Invertin	$\mu =$	9080	(Kjeldahl)
„ „ Tetanolysin durch Pepton	$\mu =$	10240	
„ „ Coli-Agglutinin durch Trypsin	$\mu =$	14200	
Koagulation von Milch durch Lab	$\mu =$	20650	
Verdauung von Kaseinsalz durch Trypsin	$\mu =$	29500	
„ „ Gelatine durch Pepsin	$\mu =$	10750	
„ „ „ „ Trypsin	$\mu =$	10570	
„ „ Hühnereiweiß durch Pepsin	$\mu =$	15570	
Präzipitation von Eiweiß durch Schwefelsäure	$\mu =$	11000	

Digitized by Google

Präzipitation von Eiweiß durch Präzipitin	$\mu =$ 6300	
Hydrolyse von Zucker durch Säuren	$\mu =$ 25600	(Spohr)
Verseifung von Äthylacetat durch NaOH	$\mu =$ 11150	(Warder).

Die freiwillige Zersetzung der verschiedenen von Madsen untersuchten Substanzen wächst 3—9 mal schneller mit der Temperatur, als der entsprechende Vorgang bei Dibrombernsteinsäure ($C_4H_4O_4Br_2 = C_4H_3O_4Br + HBr$). Die Werte von μ, die Madsen erhalten hat, gehen sogar noch über den Wert hinaus, den Tammann für Emulsin gefunden hat. Andrerseits sind die μ der katalytischen Prozesse von derselben Größenordnung wie die vorher bekannten (insbesondere das der Verseifung), denen sich auch das μ des Assimilationsprozesses mittels Chlorophyll sehr nah anschließt (vgl. S. 83). Auf alle Fälle ist es unmöglich, an der Meinung festzuhalten, daß μ für alle Reaktionsgeschwindigkeiten von derselben Größenordnung ist und nahezu einer Steigerung im Verhältnis 1:2 bei einer Temperaturerhöhung von 10^0 entspricht ($\mu = 11850$ bei 20^0, $\mu = 14400$ bei 50^0, $\mu = 17200$ bei 80^0). Da die meisten von Madsens Bestimmungen in der Nähe von 50^0 ausgeführt sind, können wir sagen, daß μ zwischen 4 und 14 mal größer ist, d. h. daß die Beschleunigung für 10^0 das $2^3 = 8$ fache bis $2^{13} = 8200$ fache des gewöhnlichen Wertes erreicht.

Kapitel 4: Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen.

Die meisten Reaktionen, mit denen sich die Serotherapie beschäftigt, gehen in heterogenen Systemen vor sich und können deshalb als analog etwa der Auflösung eines Metalls oder eines Karbonates in einer Säure betrachtet werden. Zu dieser Kategorie gehören z. B. die hämolytischen Reaktionen, die hohe Bedeutung für die theoretischen Forschungen gewonnen haben. Madsen und ich[1]) haben einige Versuche über die Geschwindigkeit der Hämolyse durch Natriumhydroxyd, Ammoniak und Tetanolysin gemacht. Die Reagentien — Lösungen der hämolytischen Substanzen und Blutemulsionen — wurden auf 37^0 erwärmt, zusammengebracht und eine bestimmte Zeit der gegenseitigen Einwirkung überlassen; dann wurde die Mischung auf 0^0 abgekühlt, um die Reaktion praktisch zum Stillstand zu bringen,

[1] Festskrift, Kopenhagen 1902, Nr. 3. Ztschr f. phys. Ch. 44, 22 (1903).

Digitized by Google

und rasch zentrifugiert. Die Farbe der Lösung zeigte die hämolysierte Menge an.

Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde unter der Annahme berechnet, daß die in der Zeiteinheit umgesetzte Menge der Zahl vorhandener Erythrocyten proportional ist. Das hämolytische Agens war in solchem Überschuß zugegen, daß seine Menge viele Male größer war, als zu vollständiger Hämolyse nötig gewesen wäre. Seine Menge wurde daher als während der kurzen Reaktionsdauer annähernd konstant betrachtet. Daher hätte die Reaktionsgeschwindigkeit ähnlich der einer monomolekularen Reaktion in homogenem System sein sollen. Eine Reihe Versuche mit 0,5 ccm 0,1 n NH_3, gemischt mit 10 ccm 2,5 prozentiger Blutemulsion, ergaben:

Zeit (Minuten):	0	6	14	23	31
Unverändertes Blut (%):	100	97	82	60	35
Reaktionskonstante:	—	0,0022	0,0062	0,0096	0,0147

Die „Konstante" wächst sehr rasch, wenn der Prozeß fortschreitet. Diese Erscheinung beruht offenbar auf etwas ähnlichem, wie die „Induktionszeit", die bei Reaktionen in heterogenen, manchmal auch in homogenen Systemen, beobachtet ist. In diesem Falle ist leicht zu verstehen, daß eine gewisse Menge Ammoniak in die Erythrocyten hineindiffundiert sein und dort einige Zeit gewirkt haben muß, ehe das Hämoglobin die Erythrocyten verläßt. Je nach verschiedenen Umständen, wie die Widerstandsfähigkeit der Zellen, Entfernung von den Ammoniakmolekeln beim Mischen, werden die einzelnen Zellen schneller oder langsamer angegriffen.

Dennoch war es möglich zu beweisen, daß die Zeit, die zur Hämolyse einer gegebenen Zahl von Erythrocyten erforderlich ist, umgekehrt proportional der Stärke des hämolytischen Agens ist. So z. B. wurden Versuche mit Lösungen gemacht, deren Verdünnung (reziproke Konzentration) sich verhielt wie 1 : 0,44 : 0,23 : 0,133 und folgende Zeiten (in Minuten) gefunden, die zur Hämolyse von 3, 10, 20, 30 und 40 % der Erythrocyten erforderlich waren. In Klammern sind die berechneten Werte gedruckt, wie sie der angeführten Regel entsprechen:

Hämolyse:	3	10	20	30	40 %
Verdünnung 1	13 (13)	26 (26)	35 (35)	44 (44)	53 (53)
„ 0,44	6 (5,7)	10 (11,5)	15 (15,4)	18 (19,4)	23 (23,3)
„ 0,23	—	5,5 (6,0)	9 (8,0)	12 (10,1)	14 (12,2)
„ 0,133	—	1,8 (3,5)	4 (4,7)	6,2 (5,9)	8 (7,1)

Die Übereinstimmung ist sehr befriedigend.

Digitized by Google

Ähnliche Versuche wurden mit Natronlauge und Tetanolysin durchgeführt. Sie führten zu ähnlichen Resultaten.

Wenn man verschiedene Mengen Ammoniak auf dieselbe Menge Blutkörperchen eine gegebene Zeitlang wirken läßt, so folgt aus den erwähnten Überlegungen, daß die hämolysierte Menge schneller als proportional der Ammoniakmenge zunimmt. Denn betrachten wir die Mengen a und 2 a, und lassen die erste während der Zeit 2 t, die zweite während der Zeit t wirken, so wird die Wirkung beider gleich sein. Lassen wir darauf die Menge 2 a nochmals während der Zeit t wirken, so ist die Reaktionsgeschwindigkeit in diesem Zeitraum viel größer als im ersten. Daher ist die von der Menge 2 a in der Zeit 2 t hämolysierte Menge mehr als doppelt so groß, wie die in der gleichen Zeit von der Menge a hämolysierte (vorausgesetzt daß die Hämolyse noch weit von Vollständigkeit entfernt ist, und daß wir die ersten Stadien des Vorganges beobachten). Es hat sich oft gezeigt, daß die hämolysierte Menge dem Quadrat der Giftkonzentration roh proportional ist, wenn dieses, wie Ammoniak und Tetanolysin, nicht sehr schnell wirkt. Diese Regel, die für viele Berechnungen von Nutzen sein kann, wird durch die folgenden Beispiele illustriert. a ist die Konzentration des Giftes, b der Hämolysegrad in Prozenten, $c = \sqrt{b} : a$.

Einfluß der Giftkonzentration auf die Hämolyse.

Tetanolysin			Ammoniak		
a	b	$c = \frac{\sqrt{b}}{a}$	a	b	$c = \frac{\sqrt{b}}{a}$
0,91	45	7,4	0,84	65	9,6
0,74	25	6,8	0,67	55	11,1
0,57	14	6,6	0,50	37	12,3
0,48	7	5,5	0,40	27	12,8
0,43	6	5,7	0,36	16	11,1
0,38	3,5	5,9	0,31	12	11,1
0,29	2,5	5,5	0,27	6	9,2
0,24	2,5	6,6	0,22	5	10,2
0,20	1,7	6,5			

In andren Fällen, und allgemein bei rasch wirkenden hämolytischen Agenzien, stimmt die Regel nicht, sondern der Wert von c sinkt schnell ab, wenn der Grad der Hämolyse unter 10 % sinkt. Solche sind die stark dissoziierten Basen, Ätzkali, Ätznatron und Lithion, sowie auch Solanin.

Das Blut bindet oft eine gewisse Menge des zugesetzten Giftes, so daß unterhalb einer bestimmten Konzentration überhaupt keine Hämolyse auftritt. Das war z. B. der Fall, wenn 10 ccm einer 10 %

Digitized by Google

Erythrocyten enthaltenden Emulsion und weniger als 0,015 Milligramm-Äquivalente Ätznatron oder Ammoniak gemischt wurden. Die gebundene Menge ist der Erythrocytenmenge sehr genau proportional (vgl. S. 73).

Etwas Analoges hat sich, nach Versuchen von Madsen und Henderson-Smith, bei Tetanolysin gefunden. Sie setzten verschiedenen Mengen q von Tetanolysin zu 10 ccm einer 2 prozentigen Emulsion von Pferde-Erythrocyten, und bestimmten die Zeit, die bei 37° erforderlich war, um einen bestimmten Grad der Hämolyse zu erzeugen. Die Resultate sind:

Hämolyse durch verschiedene Mengen Tetanolysin bei 37°.

q	t	(q — 0,25) t	q	t	(q — 0,25) t
1,0	2	1,50	0,4	11,8	1,77
0,8	2,8	1,54	0,35	13,5	1,35
0,6	4,5	1,48	0,3	28,5	1,42
0,5	6,1	1,52	0,25	∞	
0,45	7,1	1,42			

Die Zeit ∞ bedeutet, daß die Menge 0,25 Tetanolysin keine merkliche Hämolyse gibt. Das Produkt aus der wirkenden Menge (q — 0,25) und der Wirkungszeit ist offenbar konstant.

Die Agglutinine zeigen im allgemeinen Verhalten eine große Ähnlichkeit mit den Hämolysinen. Es ergibt sich das aus Versuchen, bei denen man verschiedene Mengen q eines Agglutinins gegen Bacillus coli auf untereinander ähnliche Emulsionen dieses Bacillus bei 37° wirken ließ. Die Zeit t, die nötig war, um denselben Grad der Agglutination hervorzubringen, ergab sich dann der Menge q umgekehrt proportional, wie aus den folgenden Tabellen zu sehen ist.

Wirkung verschiedener Agglutininmengen auf Bacillus coli bei 37° (Madsen).

q	t (Min.)	q t	q	t (Min.)	q t
0,08	20	(1,6)	0,008	140	(1,12)
0,035	30	1,05	0,006	150	0,90
0,025	45	1,11	0,0055	165	0,91
0,017	60	1,02	0,005	180	0,90
0,012	90	1,08	0,004	210	0,84
0,008	120	0,96	0,0035	240	0,84
0,005	180	0,90	0,003	300	0,90
0,004	240	0,96	0,0022	420	0,92
0,003	300	0,90	0,002	480	0,96
0,0027	360	0,97			Mittel 0,90
		Mittel 0,99			

Die ersten Zahlen geben eine zu schwache Wirkung (zu lange Zeit). Das mag auf Fehlern in der Zeitmessung beruhen. Es wird

Digitized by Google

vorausgesetzt, daß die Flüssigkeiten sofort auf die Temperatur des Thermostaten kommen, wenn sie hineingesetzt werden. Das ist offenbar nicht ganz richtig und daher müßte, bei genauerer Rechnung, eine bestimmte Zeit von der beobachteten abgezogen werden.

Henri[1]) beschreibt einige interessante Versuche über die Hämolyse von Erythrocyten aus Hennen durch normales Hundeserum. Er mischte verschiedene Mengen des Serums mit 30 ccm einer 10prozentigen Emulsion der Erythrocyten und soviel 0,9 prozentige NaCl-Lösung, daß das ganze Volumen 40 ccm betrug. Dann beobachtete er, daß die Hämolyse zuerst schnell, dann langsamer vonstatten ging, bis sie einen Grenzwert erreichte. Für diesen Grenzwert fand er:

Serummenge in ccm (q)	0,3	0,4	0,5	0,75	1	1,5
Grenze der Hämolyse in %	15	19,5	30	56	93	100
$93 \cdot q^{\frac{3}{2}}$	15,3	23,5	33	60	93	(100)

Der Grenzwert wächst schneller als die erste Potenz der Serummenge, aber langsamer als ihr Quadrat. Wie die untersten Zahlen zeigen, ist der Grenzwert nahezu der Potenz $\frac{3}{2}$ von q proportional.

Um den Fortschritt der Hämolyse mit der Zeit zu zeigen, gibt Henri folgende Zahlen (die Maximalzahl 100 entspricht vollständiger Hämolyse):

Serummenge in ccm	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5	0,75	1	1,5	2
Hämolyse in % nach 12 Min.	—	—	—	—	—	—	8,5	19,1	30
							(8,5)	(19,1)	(34)
„ „ „ „ 36 „	—	—	5,0	6,9	10,0	28,2	66,6	95,6	—
			(4,5)	(8,0)	(12,5)	(28,1)	(50)	(100)	—
„ „ „ „ 76 „	—	4,1	8,4	13,0	19,5	47,0	78,5	98,3	100
		(3,1)	(7,0)	(12,5)	(19,5)	(43,9)	(78)	(100)	(100)
„ „ „ „ 107 „	3,3	5,5	11,7	15,7	23,6	50,0	85,0	100	100
	(2,0)	(3,6)	(8,0)	(14,3)	(22,3)	(50,0)	(89,0)	(100)	(100)
„ „ „ „ 200 „	4,8	7,9	14,4	18,3	29,0	55,0	90,0	100	100
	(2,4)	(4,3)	(9,6)	(17,1)	(26,7)	(60)	(100)	(100)	(100)

In Klammern sind die Zahlen geschrieben, die dem Quadrate der Menge hämolysierenden Serums proportional sind. Wie man sieht, ist die Übereinstimmung mit den beobachteten Zahlen innerhalb der Beobachtungsfehler recht gut, solange die Zeit unter 76 Minuten liegt (meistens läßt man das Gift ungefähr 1 Stunde wirken). Bei längerer Reaktionszeit ist die Wirkung kleiner Mengen etwas größer, als die Regel der Quadratwurzeln verlangt.

Henri fand, daß der Fortschritt mit der Zeit sehr nahe dem Gesetze der monomolekularen Reaktion folgt. Er mischte 30 ccm einer 10prozentigen Emulsion von Erythrocyten einer Henne mit

[1] Victor Henri, C. r. de la Société biologique 14. Jan. 1905, Bd. 58, 36—39.

Digitized by Google

9,5 ccm einer 0,8 prozentigen Chlornatriumlösung und folgenden Mengen Serum. Die Hämolyse x ist auf ihren Grenzwert als Einheit bezogen. Die Reaktionskonstanten sind nach der Formel berechnet:

$$\varkappa = \frac{1}{t} \log \frac{1}{1-x}$$

Serummenge in ccm	0,3		0,4		0,5		0,75	
	x	$\varkappa$	x	$\varkappa$	x	$\varkappa$	x	$\varkappa$
Reaktionszeit 24 Min.	0,33	0,0072	0,35	0,0077	0,33	0,0072	0,50	0,0125
„ 63 „	0,56	0,0057	0,67	0,0076	0,65	0,0072	0,83	0,0122
„ 94 „	0,78	0,0070	0,80	0,0074	0,79	0,0072	0,90	0,0106
„ 190 „	0,96	0,0071	0,94	0,0065	0,96	0,0071	0,98	0,0090

Eine andre Versuchsreihe scheint zu zeigen, daß der Wert $\varkappa$ unabhängig von der Erythrocytenmenge ist, und schneller wächst, als in Proportion zur Serummenge. (Es ist recht merkwürdig, daß sich dieses Verhalten nicht in obigen Zahlen ausspricht.)

Madsen hat mit Unterstützung von Walbum und Noguchi[1]) zahlreiche Versuche angestellt, die die Reaktionsgeschwindigkeit verschiedener Stoffe bei verschiedenen Temperaturen betreffen. Ihre Methode bestand darin, die Mengen desselben Agens, z. B. Hämolysin, zu bestimmen, die erforderlich waren, um in gegebener Zeit, z. B. 10 Minuten, eine bestimmte Wirkung hervorzubringen. Je niedriger die Temperatur war, desto größere Mengen des Agens müssen im allgemeinen angewandt werden. Nehmen wir Ammoniak als Beispiel, so wissen wir, daß die zur Erzielung der gleichen Wirkung nötige Zeit der angewandten Ammoniakmenge umgekehrt proportional ist, vorausgesetzt, daß die Menge bedeutend größer ist, als zu vollständiger Hämolyse in sehr langer Zeit nötig wäre. Zeigt nun der Versuch (vgl. S. 71) z. B., daß eine Zumischung von 0,085 ccm Ammoniaklösung zu 8 ccm einer 1 prozentigen Emulsion von Pferdeblut-Erythrocyten bei 34,8° in 10 Minuten dieselbe Wirkung hat, wie 0,17 ccm derselben Lösung bei 29,7°, während die andren Bedingungen unverändert sind, so schließen wir, daß eine Zumischung von 0,085 ccm bei 29,7° 20 Minuten brauchen würde, um dieselbe Wirkung zu erzielen, d. h. die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei 34,8° doppelt so groß, wie bei 29,7°. Allgemein gegesprochen, die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei diesen Versuchen der angewandten Menge umgekehrt proportional. Offenbar ist diese Schlußfolgerung nur in solchen Fällen zutreffend, wo die Schnelligkeit der Reaktion der Menge der wirkenden Substanz proportional ist, wie beim Ammoniak; aber das scheint allgemein gültig zu sein, wenn

[1]) Madsen und Walbum, Overs. danske Vid. Selsks. Forh. 1904, 425. Madsen und Noguchi ebenda, 447.

Digitized by Google

man eine Korrektion für den ersten Teil des Giftes anbringt, der von den Erythrocyten neutralisiert wird. In den meisten Fällen scheint auch diese Korrektion von untergeordneter Bedeutung zu sein. Wir können wieder die Formel benutzen:

$$\frac{v_1}{v_0} = e^{\frac{\mu}{2}\frac{(T_1 - T_0)}{T_0 T_1}}$$

wo v_1 und v_0 die Geschwindigkeiten bei den absoluten Temperaturen T_1 und T_0 bezeichnen und μ eine charakteristische Konstante ist. Wir brauchen darin die Geschwindigkeit v nur durch den reziproken Wert der Konzentration, die zur Erzeugung der verlangten Wirkung nötig ist, zu ersetzen. In der Tat zeigt sich, daß die Versuche sehr gut mit der Formel übereinstimmten, wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht, in der die tatsächlich beobachteten Konzentrationen mit den berechneten Werte verglichen sind. z bedeutet die Reaktionszeit, t die Temperatur, q die zu 8 ccm zugesetzte Menge in ccm = reziproker Wert der Geschwindigkeit v.

Ammoniak 0,5 normale Lösung.

z = 10 Min.			z = 20 Min.			z = 30 Min.		
t	q beob.	q ber.	t	q beob.	q ber.	t	q beob.	q ber.
39,5	0,04	0,043	39,2	0,03	0,029	39,5	0,027	0,023
34,8	0,085	0,083	34,8	0,05	0,05	34,8	0,035	0,039
29,7	0,17	0,17	30,2	0,085	0,081	29,7	0,07	0,072
25,9	0,3	0,3	25,7	0,19	0,17	25,9	0,13	0,12
21,0	0,60	0,64	21,0	0,3	0,32	21,0	0,25	0,23
$\mu = 26760$			15,7	0,55	0,69	15,2	0,5	0,5
			$\mu = 24360$			$\mu = 23020$		

z = 60 Min.			z = 100 Min.			z = 180 Min.		
t	q beob.	q ber.	t	q beob.	q ber.	t	q beob.	q ber.
39,2	0,019	0,014	39,1	0,02	0,018	39,0	0,015	0,015
34,8	0,024	0,022	34,6	0,025	0,025	34,7	0,0185	0,0185
30,2	0,035	0,035	30,7	0,025	0,034	30,9	0,023	0,023
25,7	0,05	0,056	25,9	0,045	0,051	25,9	0,030	0,029
15,7	0,17	0,17	21,3	0,06	0,075	21,5	0,040	0,037
12,2	0,26	0,26	16,1	0,115	0,12	16,1	0,050	0,050
$\mu = 19150$			12,2	0,17	0,17	$\mu = 9441$		
			$\mu = 14920$					

Wie man aus diesen Zahlen sehen kann, ist die Formel hier wohl anwendbar. Wir beobachten auch, daß die Größe μ mit abnehmender Reaktionszeit zunimmt. Bei langen Reaktionszeiten überschreiten die angewandten Ammoniakmengen die für totale Hämolyse nötige Menge nicht sehr, und dann sind unsre Vorraussetzungen nicht

Digitized by Google

erfüllt. Der wirkliche Wert von μ, der den theoretischen Annahmen entspricht, ist daher der, dem sich die μ-Werte mit abnehmender Reaktionszeit nähern. Er scheint nicht sehr von dem verschieden zu sein, der für $z = 10$ Minuten gilt. Die Anwendbarkeit der bekannten physikalisch-chemischen Gleichung selbst für längere Zeiten macht es äußerst wahrscheinlich, daß sie für den Grenzwert gilt, der in außerordentlich kurzer Beobachtungszeit erreicht werden würde, wenn es möglich wäre, ihn direkt zu beobachten. Bei den Vorgängen in heterogenen Systemen stößt die direkte Beobachtung der Reaktionsgeschwindigkeit in den meisten Fällen auf große Schwierigkeiten, wie oben angedeutet wurde, es werden daher die indirekten Beobachtungen, so wie sie Madsen, Noguchi und Walbum ausgeführt haben, zu Hilfe genommen werden müssen, um Kenntnis dieser Erscheinungen zu erlangen. Ich gebe deshalb hier die Werte von μ wieder, die sie für verschiedene Basen und Säuren gefunden haben. Das Temperaturintervall war stets 12—39°. Die Versuche wurden in derselben Weise angeordnet, wie die auf Ammoniak bezüglichen.

0,2 n Natriumhydroxyd

t (Min.)	μ
10	15200
20	9500
30	9400
40	9200
50	7400
60	7200
80	6900
100	6300
180	5700

0,2 n Kaliumhydroxyd

t (Min.)	μ
10	11700
20	9200
30	8300
40	8000
60	6100
120	5200
180	4100

0,1 n Ameisensäure

t (Min.)	μ
10	8800
20	7600
30	4300
40	2600
50	2900
180	900

1 n Essigsäure

t (Min.)	μ
10	23600
15	22200
20	18100
40	15500
50	14200
60	13200
90	8800
120	7500
210	5100

1 n Propionsäure

t (Min.)	μ
10	24900
20	18100
30	15900
40	15100
60	13700
90	7700
120	5100
180	4800

1 n Buttersäure

t (Min.)	μ
10	21600
20	19900
30	15200
40	14000
50	13200

1 n Maleinsäure

t (Min.)	μ
10	12700
20	9100
30	8300

1 n Citrakonsäure

t (Min.)	μ
10	13500
20	11700
50	4400

1 n Itakonsäure

t (Min.)	μ
15	17000
20	15600

0,1 n Oleinsäure

t (Min.)	μ
10	25800
22	23400

Digitized by Google

Diese Zahlen geben Anlaß zu ähnlichen Bemerkungen, wie wi sie über das Verhalten von Ammoniak gemacht haben. Wenn wir Versuche, die sich über eine sehr lange Zeit erstrecken, ausführen könnten, so würde die Temperatur wahrscheinlich einen sehr geringfügigen Einfluß ausüben. Um eine bestimmte Wirkung zu erzielen, z. B. totale Hämolyse, oder die erste erkennbare Spur von Hämolyse, wäre eine bestimmte, der Menge anwesender Erythrocyten äquivalente Menge Base oder Säure notwendig.

Madsen und ich fanden folgende Werte für die größte Menge q einer 0,05n NaOH- oder einer 0,037n NH_3-Lösung, die ohne merkliche Wirkung zu 10 ccm Pferdeblutemulsion von n% Gehalt an Erythrocyten zugegeben werden konnte:

	NaOH		NH_3	
n	q beob.	q ber.	q beob.	q ber.
20	0,6	0,6	0,82	0,82
10	0,27	0,3	0,42	0,41
5	0,14	0,15	0,19	0,20
2,5	0,09	0,075	0,11	0,10
1,25	0,047	0,038	0,055	0,05
0,62	0,018	0,019	0,027	0,025
0,31	0,011	0,010	0,014	0,013

Die berechneten Werte sind unter der Annahme gefunden, daß 0,6 ccm der 0,05n NaOH-Lösung, die 0,082 ccm der 0,037n NH_3-Lösung entsprechen, mit 10 ccm einer 20prozentigen Emulsion äquivalent sind, indem sie die erste Spur von Hämolyse erzeugen. Diese Vorstellung der Äquivalenz ist offenbar richtig, obwohl die Reaktionszeit hier nur eine Stunde betrug (bei 37°). Damit steht auch die von Madsen und Walbum gefundene Tatsache in Übereinstimmung, daß äquivalente Mengen der vier untersuchten Basen, nämlich NH_3, NaOH, KOH und $Ba(OH)_2$, zu derselben Blutmenge zugefügt werden mußten, um die erste Spur einer Wirkung hervorzurufen. Auch bei den 19 verschiedenen Säuren waren die entsprechenden Mengen in allen Fällen äquivalent, aber doppelt so groß wie bei den Basen. Die Reaktionszeit betrug hier 24 Stunden bei 16,2°. Hier haben wir es offenbar nicht mit einer Reaktionsgeschwindigkeit zu tun, sondern mit einer starken chemischen Bindung der Säuren und Basen an irgend eine Substanz in den Erythrocyten.

Dasselbe gilt nach Madsens, Walbums und Noguchis Versuchen auch für die andre Reaktion, die beobachtet wurde, und die nicht weit von vollständiger Hämolyse entfernt war, wenn wir die Zahlen für lange Zeiten und hohe Temperatur (37—39°) betrachten,

Digitized by Google

wo die Reaktion fast zu Ende verlaufen ist. Die 3 Basen geben für diesen Endwert: KOH = 0,008, NaOH = 0,008 und NH_3 = 0,0075 ccm der 1n Lösungen. Innerhalb der Versuchsfehler sind diese Mengen äquivalent. Für die untersuchten Säuren finden wir folgende Zahlen in ccm der 1n Lösungen: Ameisen 0,012, Essig 0,015, Propion 0,017, Butter 0,017, Malein 0,013 und Citrakon 0,012. Diese Zahlen unterscheiden sich nicht sehr voneinander, sie sind zwar für die schwächeren Säuren etwas höher als für die stärkeren, was vielleicht auf eine, nicht allzu große, hydrolytische Wirkung hindeutet. Aber im ganzen weisen sie auf eine Bindung hin, wenn auch nicht von ganz so starker Art wie bei den Basen. Bei sehr langen Reaktionszeiten beobachten wir demnach keine wirkliche Reaktionsgeschwindigkeit, sondern eine Bindung, und danach könnten wir erwarten, daß für diese langen Reaktionszeiten die Werte von μ sich Null nähern. Diese Konvergenz ist bei den starken Säuren und Basen, die rasch reagieren, leichter zu erreichen als bei den schwachen. So braucht z. B. eine Dose von 0,1 ccm normal NH_3 210 Minuten, um denselben hämolytischen Effekt zu geben, wie ihn die äquivalente Menge der drei untersuchten starken Basen in 15 Minuten gibt (bei 16,2°), und ein Zusatz von 0,05 ccm Dichloressigsäure erzeugt dieselbe hämolytische Wirkung in 5 Minuten, wie die äquivalente Menge Essigsäure in 60 Minuten. Daher scheint für starke Säuren und Basen selbst die kürzeste Zeit (10 Minuten), die bei diesen Untersuchungen angewandt worden ist, schon viel zu lang zu sein, um für μ einen Wert μ_0 zu geben, der sich dem Wert für unendlich kurze Zeit nähert, also dem Wert für die wirkliche Reaktionsgeschwindigkeit. Andrerseits unterscheiden sich die Werte für die kürzeste Zeit und schwache Säuren nicht sehr voneinander und wahrscheinlich auch nicht von dem theoretischen Grenzwert, der etwa $\mu = 27\,000$ zu sein scheint. Für Ammoniak liegt der wahre Zeitgrenzwert vielleicht ein wenig höher, $\mu = 29\,000$. Diese Grenzwerte gelten wahrscheinlich auch für die andren Säuren und Basen. Der große Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen starken und schwachen Basen resp. Säuren scheint darauf hinzudeuten, daß wir es auch hier mit einer Ionenreaktion zu tun haben. Zwar müßten die Unterschiede viel größer sein als beobachtet ist, aber die Erscheinungen dürften durch die relativ lange Beobachtungszeit gestört sein.

Die Ölsäure unterscheidet sich ziemlich stark von den andren Säuren, indem sie in etwa fünfmal geringerer Menge wie andre schwache Säuren dieselbe Wirkung zeigt. Das hämolytische Agens dieser Säure ist daher wahrscheinlich nicht nur das Wasserstoffion,

Digitized by Google

wie bei andren Säuren, sondern auch ihr undissozierter Anteil übt einen hämolytischen Einfluß aus (vgl. die Wirkung von Oleaten und Triolein S. 76).

Die Lysine bakteriellen Ursprungs erreichen den Endwert ihrer hämolytischen Wirkung noch viel langsamer als selbst Ammoniak. Daher ist bei diesen Substanzen wahrscheinlich der aus den Versuchen abgeleitete Wert von μ vom theoretischen nicht sehr verschieden. Wir geben einige Zahlen aus Madsens und Walbums Reihen wieder.

Einfluß der Temperatur auf die Wirkung von Lysinen bakteriellen Ursprungs.

Streptolysin (20 Min.)			Vibriolysin (20 Min.)			Tetanolysin (60 Min.)		
Temp.	q beob.	q ber.	Temp.	q beob.	q ber.	Temp.	q beob.	q ber.
36,1	0,08	0,08	35,3	0,17	0,10	30,4	0,40	0,37
31,1	0,20	0,21	29,8	0,25	0,25	25,6	0,50	0,53
25,8	0,40	0,54	26,3	0,4	0,4	21,9	0,80	0,66
22,9	1,30	1,15	20,6	1,0	1,0	15,4	1,00	1,00
$\mu = 31\,900$			$\mu = 27\,300$			12,1	1,30	1,27
						$\mu = 10\,900$		

Die μ-Werte für Streptolysin und Vibriolysin unterscheiden sich wahrscheinlich nicht sehr vom Grenzwert μ_0. Die Übereinstimmung der beobachteten und berechneten Werte scheint ziemlich große Versuchsfehler anzuzeigen, die den Wert von μ verhältnismäßig unsicher machen. Für Vibriolysin sind 4 Werte gegeben, entsprechend den Zeiten 20, 40, 100 und 180 Minuten, und zwar 27 300, 24 400, 19 300 und 15 800. Sie scheinen darauf hinzuweisen, daß der Grenzwert etwas über 27 300 liegt, aber die Rechnung würde bessere Übereinstimmung geben, wenn im ersten Falle μ gleich etwa 25 000 gesetzt würde, welcher Wert daher vielleicht dem Endwert ziemlich nahe kommt. Die einzige Tatsache, die sicher behauptet werden kann, ist die, daß diese Werte von nahezu derselben Größe sind, wie die für die hämolytische Wirkung (schwacher) Säuren und Basen. Vielleicht würde eine genauere Untersuchung zeigen, daß sie zusammenfallen, was einen physikalischen Sinn hätte, nämlich, daß die Temperaturbeschleunigung der Reaktion wahrscheinlich in einer Veränderung der Beschaffenheit der Erythrocyten ihren Grund hat.

Zwei andre hämolytische Substanzen sind von denselben Autoren untersucht worden, nämlich Natriumoleat und Triolein. Sie wurden mit derselben Blutemulsion, die für die andren Versuche gedient hatte, geprüft, nämlich mit 8 ccm einer 1prozentigen Emulsion von Erythrocyten aus Pferdeblut, und gaben folgende Resultate:

Digitized by Google

0,01 n Natriumoleat (10 Min.)		
Temp.	q beob.	q ber.
36,3	0,125	0,125
31,4	0,14	0,14
24,1	0,18	0,16
15,9	0,19	0,19
12	0,20	0,21
4	0,25	0,25
	$\mu = 3800$	

0,01 n Triolein (15 Min.)		
Temp.	q beob.	q ber.
38,9	0,17	0,17
35,7	0,20	0,20
30,9	0,32	0,26
24,0	0,4	0,40
	$\mu = 13\,800$	

In bezug auf die Größe von μ scheinen sich das Oleat und das Triolein von andren Lysinen zu unterscheiden. Die Formel gibt die beobachteten Resultate innerhalb der Grenzen der Beobachtungsfehler wieder.

Die Änderung des Agglutinierungsvermögens mit der Temperatur wurde in analoger Weise untersucht. Die Werte für Merkurichlorid, Ricin, Coli- und Typhusagglutinin, und zwar für die kürzeste angewandte Zeit, sind wie folgt:

Einfluß der Temperatur auf Agglutination mittels

0,1 n $HgCl_2$ (45 Min.)		
Temp.	q beob.	q ber.
35,8	0,085	0,085
30,9	0,15	0,15
25,9	0,25	0,24
21,9	0,55	0,36
16,1	0,60	0,65
12,3	1,00	0,98
	$\mu = 17\,900$	

Ricin (30 Min.)		
Temp.	q beob.	q ber.
36,2	0,05	0,05
27,9	0,12	0,11
15,6	0,33	0,37
10,1	0,70	0,66
0,9	1,30	1,80
	$\mu = 17\,200$	

Coli-Agglutinin (10 Min.)		
Temp.	q beob.	q ber.
38,6	0,005	0,0043
34,9	0,0055	0,0072
30,9	0,015	0,0135
24,9	0,045	0,042
21,2	0,065	0,068
12,9	0,30	0,30
	$\mu = 30\,100$	

Typhus-Agglutinin (10 Min.)		
Temp.	q beob.	q ber.
38,2	0,002	0,002
31,1	0,007	0,0083
27,4	0,02	0,018
19,2	0,13	0,09
15,9	0,20	0,20
11,5	0,55	0,55
	$\mu = 37\,200$	

Die beiden Agglutinine geben bei der Einwirkung auf (Pferde-) Erythrocyten auffallend ähnliche Werte von μ, obwohl die Reaktionszeit ziemlich lang ist. Aus den μ-Werten für längere Zeiten scheint hervorzugehen, daß der Grenzwert von μ für die beiden Bakterienagglutinine wahrscheinlich nicht sehr von dem oben gegebenen abweicht. Es ist beim Typhus-Agglutinin $\mu_{40} = 33\,000$, $\mu_{120} = 18\,700$ und $\mu_{180} = 8500$, wobei die Indexe die Zeit in Minuten darstellen.

Digitized by Google

Beim Coli-Agglutinin liegen zwei verschiedene Reihen vor. Eine davon verläuft regelmäßig, so daß μ mit wachsender Zeit sinkt. In der andren Reihe tritt eine Störung auf, der μ-Wert sinkt zuerst, geht dann durch ein Minimum, darauf durch ein Maximum, und sinkt schließlich mit zunehmender Zeit gegen Null. Die beiden Reihen sind mit denselben Präparaten ausgeführt, so daß die Unterschiede als rein zufällig angesehen werden können. Aber der Grenzwert μ_0 scheint in beiden Reihen nahezu derselbe zu sein.

Die Erscheinung der Agglutination hat mit der Hämolyse in ihrer Abhängigkeit von Zeit und Temperatur große Ähnlichkeit. Wir wissen aus Eisenberg und Volks Versuchen[1]), daß die Absorption der Agglutinine in wenigen Minuten (weniger als 5) den Gleichgewichtszustand erreicht. Doch nimmt die Agglutination stundenlang zu, besonders bei niedrigeren Temperaturen. Die Erscheinung schreitet mit der Zeit genau wie die Hämolyse vor sich, obwohl die hämolytische Substanz vor der ersten Beobachtung absorbiert ist. Folgende Zahlen mögen diese Eigentümlichkeit illustrieren; sie geben die Menge Coli-Agglutinin, die erforderlich ist, um bei 36,6 und 12,3° einen bestimmten, beobachteten Agglutinationsgrad zu erreichen:

Zeit (Min.) . .	20	30	50	65	80	120
$q_{beob.}$ bei 36,6°	4	1	0,5	0,2	0,13	0,1
$q_{beob.}$ bei 12,3°	85	26	10	2	1,6	0,32

Die Zahlen weisen darauf hin, daß der Grenzwert für unendliche Zeit nach 120 Minuten bei der höheren Temperatur nahezu erreicht ist, bei der niedrigeren dagegen nicht, und daß dieser Grenzwert in den beiden Fällen von derselben Größenordnung (wahrscheinlich gleich) ist. Der Fortschritt der Agglutination mit der Zeit zeigt an, daß nach der Absorption des Agglutinins (nach Verlauf von 5 Minuten) langsam eine Veränderung mit den Bakterien vor sich geht. Ebenso wird ein Hämolysin sehr schnell von den Erythrocyten aufgenommen, worauf sie einer langsamen chemischen Veränderung unterworfen sind, die zur Folge hat, daß sie ihren Farbstoff verlieren. Diese Tatsache scheint ziemlich unverträglich mit der oft geäußerten Vorstellung, daß die Agglutination auf einer elektrischen Ladung der Bakterien beruht, die sie durch die Absorption des Agglutinins gewinnen. Denn die elektrische Ladung stellt sich höchstwahrscheinlich unmittelbar nach der Absorption des Agglutinins ein.

Diese groß angelegten Untersuchungen haben uns auch mit einigen Substanzen vertraut gemacht, deren Wirkung mit sinkender

[1]) Eisenberg und Volk, Ztschr. f. Hygiene, 40, 155 (1902).

Digitized by Google

Temperatur zunimmt oder ein Maximum oder Minimum bei einer bestimmten Temperatur hat. Als Beispiele seien angeführt die hämolytischen Wirkungen von Schlangengift, erzeugt von der Wasserlanzenschlange (Ancistrodon piscivorus) und von der Cobra (Brillenschlange, Naja tripudians), sowie von Staphylolysin, erzeugt von Staphylococcus.

Hämolytische Wirkung bei verschiedenen Temperaturen von

Gift der Wasserlanzenschlange				Cobragift		Staphylolysin			
Zeit 5 Min.		Zeit 15 Min.		Zeit 15 Min.		Zeit 15 Min.		Zeit 45 Min.	
Temp.	q beob.	Temp.	q beob.	Temp.	q beob.	Temp.	q beob.	Temp.	q beob.
39,3	0,38	39,3	0,28	37,3	0,225	36,5	0,35	36,4	0,35
35,2	0,36	35,2	0,28	30,8	0,25	29,1	0,17	28,6	0,08
30,7	0,35	30,7	0,3	24,1	0,30	24,3	0,23	24,4	0,07
28,2	0,35	28,2	0,33	17,7	0,30	19,5	0,33	19,7	0,075
19,2	0,3	19,2	0,3	14,2	0,25	13,6	0,18	11,3	0,6
14,8	0,3	14,8	0,25	10,8	0,25				
10,6	0,25	10,6	0,23						

Die Schlangengifte wurden mit Pferdeblut, das Staphylolysin mit Kaninchenblut geprüft. Die beobachtete Erscheinung ist wahrscheinlich zusammengesetzter Art. Ein Maximum kann sich ergeben, wenn das hämolytische Agens mit zunehmender Temperatur zersetzt wird. Dann verhalten sich die Gifte bei niederer Temperatur, wo die Zersetzung unbedeutend ist, normal, d. h. die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit der Temperatur zu. Wenn dann bei höheren Temperaturen die Zersetzung oder Dissoziation des giftigen Stoffes rascher mit der Temperatur zunimmt, als die wahre Reaktionsgeschwindigkeit, dann wird zu einem bestimmten hämolytischen Effekt (in gegebener Zeit) eine Giftmenge nötig sein, die mit der Temperatur zunimmt. Eine genauere Untersuchung dieser verwickelten Erscheinungen wird zeigen, ob eine Erklärung analog der hier skizzierten annehmbar ist.

Die bisher in diesem Kapitel behandelten Erscheinungen sind, allgemein betrachtet, sowohl von Reaktionsgeschwindigkeiten wie von wirklichen chemischen Gleichgewichten abhängig. Die letzten wiegen um so mehr vor, je länger die Reaktionszeit, und je höher die Temperatur ist. Die Beobachtungen haben ihre große Bedeutung, weil sie der tatsächlich angewandten Arbeitsmethode, die durch die Natur des Materials bestimmt wird, entsprechen. Daher ist ihre Diskussion zum Verständnis der Resultate der gewöhnlichen Arbeitsmethode nützlich, sowie für die Anordnung ähnlicher Versuche. Deshalb habe ich sie ziemlich eingehend besprochen, obwohl ihre theoretische Bedeutung nicht sehr einfach ist.

Außer diesen hämolytischen und agglutinierenden Vorgängen,

Digitized by Google

bei denen sich der chemische Angriff auf Zellen richtet, die in dem wirksamen Medium aufgeschwemmt sind, ist noch eine andere Art Prozesse in heterogenen Systemen untersucht worden, nämlich die Zersetzung geronnener Eiweißkörper oder Emulsionen. Diese letzten Prozesse sind von denen in homogenen Systemen nicht sehr verschieden. Die geronnene albuminose Substanz wurde in Form eines feinen Pulvers eingeführt und die Emulsion geschüttelt.

Ein derartiger Prozeß von höchstem Interesse ist die Verdauung koagulierter Eiweißarten durch Pepsin (in Gegenwart von Säuren). Für diesen Vorgang hatte Schütz[1]) die Regel gefunden: die in einer gegebenen Zeit verdaute Albuminmenge ist der Quadratwurzel aus der Zeit und aus der Konzentration des Eiweißes proportional. Indessen geben Schütz' Zahlen, nach der Kritik Sawjalows,[2]) keine sehr genauen Resultate. Er zitiert Sjöqvists[3]) Versuche als Beweis, daß die Reaktion der Zeit proportional ist, also dem Gesetz der monomolekularen Reaktionen folgt. In Sjöqvists Versuchen war das Eiweiß koaguliertes Eialbumin in Pulverform; es wurde bei 37° C in 100 ccm einer Lösung gebracht, die 50 ccm 0,1 n-Salzsäure und 2,5, 5, 10 oder 20 ccm einer 0,067 prozentigen Pepsinlösung enthielt, der Rest war Wasser. Nach bestimmter Zeit (1—20 Stunden) wurde eine Probe der Lösung auf 0° abgekühlt, das Albumin abzentrifugiert und der Stickstoffgehalt der Flüssigkeit nach Kjeldahls Methode bestimmt. So wurde die Verdauung verfolgt. Sjöqvist fand, daß die gleiche Menge Q verdaut wird, wenn die Verdauungszeit t der Konzentration c des Pepsins umgekehrt proportional ist, wie folgende Zahlen zeigen:

c	t (Std.)	Q
0,5	16	6,90
1	8	6,70
2	4	6,77
4	2	7,00

In der ersten Zeit treten einige Abweichungen auf. Der Verlauf mit der Zeit ist aus folgenden Zahlen ersichtlich.

t (Std.)	$Q_{beob.}$	$Q_{ber.1}$	$Q_{ber.2}$
0,5	2,25	3,14	2,18
1	3,16	3,47	3,00
2	4,08	4,08	4,04

[1]) Schütz, Zeitschr. f. physiol. Chemie von Hoppe-Seyler, **9**, 557 (1885).
[2]) Sawjalow, ebenda, **46**, 307 (1905).
[3]) Sjöqvist, Skand. Archiv f. Physiologie, **5**, 1895.

Digitized by Google

t (Std.)	$Q_{beob.}$	$Q_{ber.1}$	$Q_{ber.2}$
3	4,72	4,64	4,78
4	5,24	5,15	5,35
6	6,10	6,04	6,21
8	6,84	6,77	6,84
10	7,38	7,39	7,35
12	7,84	7,90	7,76
16	8,54	8,67	8,39
20	8,94	9,21	8,83
30	9,39	9,93	9,43
40	9,85	10,21	9,90
∞	10,40	10,40	10,40

Die berechneten Zahlen $Q_{ber.1}$ sind nach der gewöhnlichen Formel der monomolekularen Reaktion gefunden, die mit $Q_{ber.2}$ bezeichneten nach der Formel, die oben (S. 44) für die Verdauung gelösten Eialbumins gegeben wurde ($\varkappa P = 52$). Wie man sieht, schließt sich letztere Formel sehr eng an die Versuche an, viel besser als die gewöhnliche Formel für monomolekulare Reaktionen. Das zeigt, daß die Verdauung in beiden Fällen denselben Gesetzen unterliegt. Bei den Versuchen über Verdauung wird oft die Methode angewandt, das koagulierte Eiweiß in kurze kapillare Röhren einzuschließen, sogenannte Mettsche Röhren. Mit Hilfe dieser Methode bestätigte Borissow die Regel von Schütz, wenn eine Lösung von Säure und Pepsin in die Röhren diffundierte, während Sawjalow, der Pepsin und Albumin mischte, fand, daß die Höhe der verdauten Albuminsäule der Pepsinmenge proportional ist, nicht ihrer Quadratwurzel, wie Borissow gefunden hatte. Wie wir gesehen haben, stimmen Sjöqvists Resultate auf das beste mit den Werten $Q_{ber.2}$ überein, die, für kurze Zeiten, mit den nach der Regel von Schütz' berechneten Werten zusammenfallen. Es muß betont werden, daß Versuche mit Mettschen Röhren nicht zur Entscheidung dieser Fragen verwandt werden können. Denn die Diffusionsgeschwindigkeit kommt dabei neben der chemischen Reaktion zur Geltung, und wenn die Diffusion der langsamere der beiden Vorgänge ist, so bewirkt sie, daß die Verdauung proportional zur Quadratwurzel aus Zeit und Konzentration fortschreitet. Ein analoger Versuch wäre, Alkalilösung in eine Mettsche Röhre diffundieren zu lassen, die mit einer phenolphtaleinhaltigen Gelatinelösung gefüllt ist. Nach einer gegebenen Zeit t wäre die Alkalikonzentration in einem bestimmten Punkt der Mettschen Röhre, wenn die umgebende Lösung die Konzentration 2 hat, doppelt so groß, als wenn sie die Konzentration 1 hat. Nun ist die Höhe, bis zu der in einer bestimmten Zeit t das Alkali von gegebener Konzentration gedrungen ist, ihrer Quadrat-

Digitized by Google

wurzel proportional. Daher ist die Verteilung des Alkalis in der ersten Röhre nach der Zeit $\frac{t}{\sqrt{2}}$ nahezu die gleiche wie die Verteilung in der zweiten Röhre nach der Zeit t. Das kann man an der Höhe der rot gefärbten Säule sehen, die in beiden Fällen gleich ist. Versuche, bei denen Pepsin diffundiert, sind von ganz demselben Charakter. Der Indikator ist hier nicht die Rötung des Phenolphtaleins, sondern die Verflüssigung der Albuminlösung. Man mißt die Höhe der verflüssigten Eiweißsäule zu gegebener Zeit. Pawlows und Borissows Versuche, die ergeben, daß die Verflüssigung von koaguliertem Eiweiß oder Gelatine proportional der Quadratwurzel aus Zeit und reagierendem Enzym (Pepsin, Trypsin usw.) fortschreitet, bringen daher keine Entscheidung zugunsten von Schütz' Regel.

Ein Prozeß, der der Eiweißverdauung sehr analog ist, ist die Verseifung der Fette mittels Magensaft oder Extrakt von Magengeweben (Steapsin). Volhard[1]) benutzte Glyzerinextrakt von Schweinsmagen und beobachtete, daß der Quotient

$$p : \sqrt{f} = \varkappa$$

aus der verdauten Menge p in Prozenten und der Quadratwurzel aus der Steapsin-Konzentration nahezu konstant ist. Die Beobachtung wurde von Stade[2]) bestätigt, wie aus folgenden Zahlen erhellt (Temp. 40°):

Glyzerinextrakt (24 Stunden)			Magensaft (1 Stunde)		
f	p	$\varkappa$	f	p	$\varkappa$
1	4,7	4,7	1	4,1	4,1
4	8,5	4,3	4	11,2	5,6
9	15,0	5,0	9	17,3	5,8
16	19,5	4,9	16	21,3	5,3
25	24,5	4,9			

Wenn die Verdauung weiter als bis 25% fortschreitet, so ist die Regel von Schütz nicht mehr anwendbar. Wir können dann die allgemeine Formel (S. 44) benutzen, wie folgende Zahlen lehren, die für Verdauung mittels Magensaft in 16 Stunden bei 40° gelten ($\varkappa = 27$):

f	p beob.	p ber.
1	21,6	21,6
4	40,7	39,6
9	50,9	54,6
16	67,4	66,7

[1]) Volhard, Zeitschr. f. klinische Medizin **42**, 414 und **43**, 397 (1901).
[2]) Stade, Hofmeisters Beiträge **3**, 291 (1902).

Digitized by Google

Stade führte auch einige Messungsreihen durch, die den Verlauf der Verseifung in einer Lösung von Fett aus Eidotter und neutralisiertem Magensaft betreffen. Diese Mengen befolgen nahezu dieselbe Formel wie die Sjöqvists, wie die berechneten Werte erkennen lassen.

Verlauf der Verseifung von Eidotter-Emulsion mittels Magensaft.

t (Std.)	p beob.	p ber.	t (Std.)	p beob.	p ber.
2	0,204	0,186	12	0,241	0,245
4	0,256	0,257	16	0,254	0,279
6	0,298	0,308	21*	0,285	0,314
8	0,353	0,348	37*	0,395	0,400
10	0,376	0,383	39*	0,398	0,409
25*	0,495	0,552	43*	0,417	0,426
29*	0,515	0,582	46	0,462	0,438
31*	0,554	0,596	65	0,536	0,502
35*	0,609	0,620			
75	0,775	0,784			

Die Zahlen mit Sternchen sind Mittel aus zwei Messungen. Die Konstanten $\varkappa P$ sind 10 und 3. Für kurze Zeiten ist die verdaute Menge der Quadratwurzel aus der Zeit proportional, wenn also sowohl die Zeit t wie die Steapsinmenge f wechselt, so ist die verdaute Menge proportional der Quadratwurzel aus dem Produkt f t. Auch diese Regel ist von Stade verifiziert worden. Stades Messungen sind von Engel[1]) wiederholt worden, sowohl mit Glyzerinextrakt (aus „Pankreatin-Rhenania"), wie mit Magensaft in ihrer Wirkung auf Eidotter-Emulsion. Folgende Zahlen geben zwei Beobachtungsreihen wieder, eine bei 30°, die andre bei 40° mit der 1,24 fachen Menge Pankreatin-Extrakt. Die Zeit der Verdauung betrug 6 bzw. 18 Stunden. Aus diesen Beobachtungen können wir die Veränderung von $\varkappa$ mit der Temperatur berechnen. Wir finden $\mu = 13\,600$.

	$t = 30°$			$t = 40°$	
f	p beob.	p ber.	f	p beob.	p ber.
1	4,7	5,0	1,24	12,8	14,1
4	10	9,8	4,96	24,7	26,8
9	15	14,6	11,16	39,5	38,2
16	19,5	19,0	19,84	51,6	48,2
25	22,3	23,4	31,0	59,5	57,1
36	24,1	27,6	44,64	63,1	64,8
	$\varkappa = 1{,}3 : 6$			$\varkappa = 8{,}9 : 18$	

Stade gibt auch einige Messungen über den Einfluß der Konzentration c des Magensaftes auf den Vorgang bei 40°; wir geben sie hier wieder. Die Zahlen der Tabelle bedeuten die hydrolysierte Menge in Prozenten (p).

[1]) Engel, Hofmeisters Beiträge 7, 77 (1905).

Digitized by Google

c	Reaktionszeit 1 Stunde		Reaktionszeit 4 Stunden		Reaktionszeit 9 Stunden		Reaktionszeit 16 Stunden		Reaktionszeit 25 Stunden	
	p beob.	p ber.	p beob.	p ber.	p beob.	p ber.	p beob.	p ber.	p beob.	p ber.
1	4,1	6,2	13,7	12,1	19,2	17,8	21,6	23,2	31,5	28,4
4	11,2	12,1	28,0	23,2	39,8	33,3	40,7	42,5	46,0	50,7
9	17,3	17,8	38,9	33,3	49,4	46,7	50,9	58,0	65,6	67,6
16	21,3	23,2	44,0	42,5	52,9	58,0	67,4	70,3	73,6	79,6
25	23,6	28,4	45,4	50,7	63,3	67,6	68,4	79,6	74,1	88,1

Wenn wir die Konstante der vier Reihen berechnen, so finden wir: 1,8, 10,7, 21, 27 und 41 oder $1 \cdot 1{,}8$, $4 \cdot 2{,}7$, $9 \cdot 2{,}3$, $16 \cdot 1{,}7$ und $25 \cdot 1{,}64$, oder im Mittel die Konstante gleich 2 t. Mit dieser Konstanten sind die berechneten Zahlen bestimmt. Die beobachteten und berechneten Werte stimmen im allgemeinen so gut, wie zu erwarten ist, untereinander überein, und die Abweichung ist wahrscheinlich nicht größer als aus den Versuchsfehlern erklärt werden kann. Bei hohen Werten von p stören vielleicht echte oder sogenannte „falsche" Gleichgewichte die Beobachtungen.

Die Rizinus-Samen enthalten ein Enzym, das das Öl dieser Samen in Säure und Glyzerin spaltet. Auch dieser Prozeß scheint denselben Gesetzen zu gehorchen, wie die Fettspaltung mittels Magensaft. Wir geben einige Zahlen aus der Abhandlung von Connstein, Hoyer und Wartenberg[1]) wieder. Sie bereiteten sich eine Emulsion, indem sie 5 g Rizinussamen in 6,5 g Rizinusöl verrieben, und darauf 4 g Säure zusetzten. Die Emulsion wurde bei konstanter Temperatur gehalten, in bestimmten Zeitabschnitten wurden Proben herausgenommen und ihr Gehalt an freier Säure titrimetrisch bestimmt. (Die von Anfang an zugesetzte Säure wurde abgezogen.) Die erste Zahlenreihe betrifft eine Emulsion in 0,1 n Schwefelsäure, die anderen sind mit Emulsionen in 0,1 und 0,4 n Essigsäure gefunden.

Schwefelsäure 0,1 n			Essigsäure 0,1 n			Essigsäure 0,4 n		
t (Min.)	p beob.	p ber.	t (Std.)	p beob.	p ber.	t (Std.)	p beob.	p ber.
15	12	20	1	50	48,6	1	65	63,9
30	20	27	2	65	62,8	2	86	78,8
45	30	32	3	70	71,5	3	84	86,5
60	33	36	4	72	77,6	4	84	91,2
90	41	43	24	80 (?)	99,5	24	91 (?)	99,9
150	54	53						
210	59	59						
330	68	69						
1620	81 (?)	97						

[1]) Connstein, Hoyer und Wartenberg, Ber. d. Deutschen chem. Ges. 35, 3988 (1903).

Digitized by Google

Die Konstanten der drei Reihen sind 1,47, 180 und 380. Die Abweichungen in den Zahlen für die längste Zeit scheinen darauf hinzuweisen, daß wir es mit einem, vielleicht falschen, Gleichgewicht zu tun haben. Wirkliche Gleichgewichte, die bei der Einwirkung von Lipase auf Äthyl-Butyrat und Glyzerin-mono-Buttersäure-Ester entstehen, sind durch die Untersuchungen von Kastle und Loevenhart,[1]) sowie von Hanriot[2]) nachgewiesen. Sie sind bei Enzymen sehr gewöhnlich, wie schon Tammann[3]) fand. Auch die Zahlen unter 45 Minuten deuten auf eine Abweichung von den Voraussetzungen, die der Rechnung zugrunde liegen.

Es liegen auch einige Beobachtungen vor, die sich auf den Einfluß der Enzymmenge beziehen. 0,5 g Rizinussamen wurden mit 5, 10, 15, 20, 25 und 50 g Rizinusöl und den gleichen Mengen 2 prozentiger Essigsäure emulsioniert. Die Resultate sind unten in der Tabelle angegeben. Die berechneten Zahlen sind unter der Annahme gefunden, daß die wirksame Masse des Enzyms seiner Menge proportional ist. Die Übereinstimmung zwischen berechneten und beobachteten Werten ist sehr befriedigend, außer bei den größten Mengen. Die Konstante für zwei Tage ist innerhalb der Versuchsfehler das Doppelte der Konstanten für einen Tag.

Wirkung von 0,5 g Rizinussamen auf verschiedene Mengen Rizinusöl.

Öl	Säure	1 Tag		2 Tage	
		p beob.	p ber.	p beob.	p ber.
50	50	49	49	49	59
25	25	60	65	74	74
20	20	71	69	80	78
15	15	77	75	87	84
10	10	81	83	86	91
5	5	89	94	92	98
		$x = 186$		$x = 300$	

Hier ist die Gegenwart einer bestimmten Menge freier Säure nötig, ungefähr 4 ccm einer 0,2 n-Lösung, die gleiche Menge bei allen, starken oder schwachen Säuren. Es erinnert das stark an die Säurewirkung bei der peptischen Verdauung. Wenn keine Säure zugesetzt wird, so wirkt die im Samen enthaltene, und neue wird von dem Prozeß selbst geliefert.

Ein lipolytischer Prozeß, der wahrscheinlich als in homogenem

---

[1]) Kastle und Loevenhart, Amer. chem. journ. **24**, 491 (1900).
[2]) Hanriot, C. r. **132**, 212 (1901).
[3]) Tammann, l. c.

Digitized by Google

System verlaufend angesehen werden muß, ist der von Zeller[1]) studierte, der das lipolytische Agenz im Fliegenpilz (Amanita muscaria) betrifft. Ein wässriger Auszug aus dem gepulverten Pilz hatte keine lipolytische Wirkung. Mischte man aber das Pulver mit Olivenöl oder Talg, so zersetzte es langsam diese Stoffe. Wir geben einige auf Olivenöl bezügliche Werte wieder.

Zeit (Stunden)	48	11,1	160	304	485	631
Zersetzung %	4,8	11,5	14,2	28,5	38,9	46,3
dgl. ber.	4,8	10,9	15,3	27,0	39,5	48,0

Diese Reaktion ist entschieden monomolekular (die zur Rechnung benutzte Konstante ist 0,00045). Die Säure aus dem Olivenöl hat offenbar keinen merklichen Einfluß auf das Enzym.

Bezüglich der lipolytischen Wirkung des Cytoplasmas von Rizinussamen sind eine große Anzahl Versuche von Nicloux[2]) gemacht worden. Er fand, daß das katalytische Agens in Wasser nicht löslich ist, welches vielmehr seine Wirkung zu hindern scheint. Die Reaktionsbedingungen scheinen daher etwa dieselben gewesen zu sein, wie bei Zellers Versuchen. Die Reaktion verläuft, bei niederer Temperatur, sehr nahe nach dem Gesetz, das für monomokulare Reaktionen gilt. Das Cytoplasma wurde in dem zu untersuchenden Öl, meist Baumwollöl, aufgeschwemmt, und darauf Wasser, das eine kleine Menge Essigsäure enthielt, zugesetzt. Folgende Zahlen (bei 18° gültig) zeigen, daß der Prozeß monomolekular ist:

t (Min.)	30	45	60	90	127	150	210	450
Verseifung % (x)	23,6	33,1	40,4	54,8	67,0	73,2	85,5	94,4
$\varkappa = \frac{100}{t} \log \frac{100}{100-x}$	0,388	0,387	0,375	0,382	0,392	0,381	0,399	0,278

Bei höherer Temperatur, etwa 25°, sinkt die Konstante $\varkappa$ im Laufe der Reaktion, wie man aus folgenden Zahlen sieht, die die Mittelwerte von $\varkappa \cdot 10^4$ während der Zeitintervalle 30—90 und 90—180 Minuten geben. Aus diesen ist ein extrapolierter Wert für die Zeit 0, den Beginn der Reaktion, berechnet, für $t = 5$ bis 20 ist der Anfangswert gleich dem Mittel aus den folgenden Werten gesetzt:

---

[1]) Zeller, Wiener Monatshefte f. Chemie **36**, 727 (1905).

[2]) M. Nicloux, C. r. de la Société de Biologie, **56**, I, 701, 702, 839, 840 u. 868 (1904).

Digitized by Google

Temp. =	5	10	15	20	25	30	35	40	45
0 Min.	7,7	12,5	14,6	20,6	26,6	30,3	40,1	34,4	27,2
30— 90 „	9,0	12,6	13,7	19,3	24,2	26,6	29,7	19,2	10,5
90—180 „	6,3	12,4	15,4	21,9	21,5	22,6	20,4	9,1	3,2
$60 \cdot \frac{d \log \varkappa}{dt}$	—	—	—	—	0,041	0,057	0,130	0,259	0,413

$\varkappa$ hat bei etwa 37° ein Maximum, das offenbar auf der raschen Zerstörung des katalytischen Agens bei höherer Temperatur beruht. Nicloux hat gefunden, daß bei 55° seine Wirkung in 10 Minuten vollständig vernichtet wird. Ein Maß dieser Zerstörung ist die Abnahme von log $\varkappa$ während des Verlaufes der Verseifung, vorausgesetzt, daß der Prozeß monomolekular ist, wie es die bei niederen Temperaturen gefundenen Werte anzeigen. Bei Temperaturen unter 25° ist diese Abnahme unmerklich, bei höheren Temperaturen geht die Zerstörung des Enzyms mit etwa der doppelten Geschwindigkeit vor sich, wenn die Temperatur um 5° wächst. Dies entspricht einem Wert $\mu = 26000$.

Der extrapolierte Wert von $\varkappa$ selbst für die Zeit 0 zeigt eine bemerkenswerte derartige Zunahme mit der Temperatur. Eine Zunahme von etwa 14° ist nötig, um ihn im Verhältnis 2 : 1 zu ändern. Der aus den Zahlen für 10° und 30° berechnete Wert von μ ist nur 7540.

Diese Untersuchung gibt einen guten Einblick in die wahre Bedeutung von Optimen. Wenn wir die Zeit 0 betrachten, so scheint das Optimum bei etwa 37° einzutreten. Im Intervall 30—90 Minuten scheint das Optimum bei etwa 33° und im Intervall 90—180 Minuten bei etwa 29° zu liegen. Die Lage des Optimums hängt augenscheinlich davon ab, wie schnell die experimentellen Manipulationen ausgeführt werden. Wenn es möglich wäre, $\varkappa$ unmittelbar nach geschehener Mischung der Reagenzien festzustellen, so würde das Optimum wahrscheinlich bei viel höherer Temperatur gefunden werden, oder es würde vielleicht überhaupt kein Optimum existieren. Es verdient erwähnt zu werden, daß das trockene Cytoplasma, in reinem Öl suspendiert, 20 Stunden lang eine Temperatur von 100° aushält. Erst bei 120° nimmt seine Aktivität ab, und zwar um ein Drittel in einer Viertelstunde.

Die recht große Ähnlichkeit der μ-Werte für verschiedene Lebensprozesse dürfte auf eine allgemeine Regel hinweisen.

Alle diese Versuche, welche einen konstanten Wert von qt ergeben, scheinen darauf hinzuweisen, daß auch hier die Reagenzien in die Partikelchen des Substrats mit einer solchen Geschwindigkeit

Digitized by Google

hineindiffundieren, daß die Diffusionszeit im Vergleich mit der Reaktionszeit als sehr klein betrachtet werden kann. Soweit sich das auf Erythrocyten und Bakterien bezieht (vgl. S. 68), ist es leicht zu verstehen, weil hier die linearen Dimensionen so winzig sind (vgl. S. 22). Das mag auch noch für die feingepulverten Koagulen von Eiweiß und für die Fetttröpfchen der Emulsionen gelten. Aber bei den Versuchen mit den Mettschen Röhren kann nicht die Rede davon sein. Hier wird der verflüssigte Teil der Säule weggeführt und mit der umgebenden Flüssigkeit vermischt, so daß diese neue Teile der Säule angreifen kann. Hier geht also die Reaktion an und unmittelbar unter der Oberfläche der koagulierten Gelatine vor sich, und die Konstanz des Produktes q t zeigt, daß unter ähnlichen Bedingungen die Zahl der in einer Sekunde verdauten Moleküle der Konzentration des Ferments in der umgebenden Flüssigkeit proportional ist (und der Oberfläche, die nahezu konstant bleibt).

Madsen und Walbum verfolgten auch den Fortgang der Auflösung von Kasein durch Trypsin. 10 g pulverförmiges Kasein wurden in 100 ccm einer 1 prozentigen Trypsinlösung aufgeschwemmt und bei konstanter Temperatur gehalten. Die Flasche, die die Mischung enthielt, wurde ständig geschüttelt, um das Kasein am Absetzen zu hindern. In verschiedenen Zeitintervallen wurden Proben herausgenommen und die ungelöste Kaseinmenge bestimmt, indem der Stickstoffgehalt nach der Kjeldahlschen Methode festgestellt wurde. Der Fortgang der Reaktion erhellt aus folgender Tabelle (Temp. 34,1 °).

t (Std.)	Stickstoff beob.	Stickstoff ber.	t (Std.)	Stickstoff beob.	Stickstoff ber.
0	0,11	0,11	48	0,060	0,058
0,5	0,108	0,109	72	0,0456	0,0464
2,5	0,102	0,105	101	0,0374	0,0376
6	0,100	0,099	125	0,0329	0,0325
11	0,096	0,091	168	0,0274	0,0269
24	0,076	0,076	192	0,0236	0,0236
33	0,070	0,068			

Der Prozeß ist berechnet nach dem Schema der bimolekularen Reaktionen, und wie man sieht, ist die Übereinstimmung sehr befriedigend. Die Beziehung kann vorläufig als rein empirisch betrachtet werden. Die Reaktionskonstante ist 0,173. Sie wächst mit der Temperatur, wie zu erwarten ist, bei 37 ° erreicht sie den Wert 0,194, entsprechend einer Zunahme im Verhältnis 1,485 : 1 im Intervall von 10 ° ($\mu = 7400$).

Zu den Prozessen in heterogenen Systemen gehören auch viele

Digitized by Google

normale Lebensprozesse. Soweit ihre Reaktionsgeschwindigkeiten bekannt sind mögen sie deshalb kurz Erwähnung finden. Sie stimmen in ihrem allgemeinen Verhalten mit einigen der vorhin erwähnten auffallend überein.

Der im Haushalt der Natur unvergleichlich wichtigste dieser Prozesse ist die Erscheinung der Assimilation und Ausatmung der Kohlensäure durch Pflanzen. Wie van't Hoff[1]) bemerkt, scheinen die Beobachtungen von Clausen[2]) darauf hinzudeuten, daß die Kohlensäuremenge, die von Weizen- und Lupinenkeimlingen und von Fliederblüten abgegeben wird, innerhalb des Temperaturintervalls von 0°—25° im Verhältnis 1:2,5 wächst, wenn die Temperatur um 10° steigt ($\mu = 14800$). Die drei Pflanzen zeigen Optimen je bei 41, 38 und 42°.

Godlewski[3]) zeigte, daß die Assimilationstätigkeit der Blätter von vier verschiedenen Pflanzenarten — die regelmäßigsten Resultate gaben Blätter von Typha latifolia — mit dem Kohlensäuregehalt der umgebenden Luft zunahm, und war bis zu 2% ziemlich genau proportional damit. Bei weiterer Konzentrationsvermehrung nahm die Assimilation nur noch sehr langsam zu; bei 6% trat ein Optimum auf. Dieser Prozeß ist neuerdings von Fräulein Gabrielle Matthaei[4]) studiert worden, sie fand die Kohlensäure-Assimilation, die ein Blatt von Prunus laurocerasus bewirkt, in folgender Weise mit der Temperatur veränderlich (bezogen auf eine Blattfläche von 50 cm² und 1 Stunde).

Temp.	Assimilation beob.	mg CO_2 ber.
0	1,75	1,75
10	4,2	3,79
20	8,9	7,81
30	15,7	15,3
37	23,8	23,8

Dieser Prozeß ist in jeder Beziehung analog einer Fermentwirkung, das Chlorophyll kann dabei für das wirksame Ferment gelten.

Der Wert von μ ist 11 940. Schon in diesen Zahlen bemerken wir einen schnelleren Zuwachs bei niedrigen Temperaturen, als die Formel angibt. Wenn die Temperatur unter 0° sinkt, so nimmt die Assimilation sehr schnell ab, und die bei —6° beobachtete Zahl ist nur 0,2 mg, was einem μ-Wert zwischen 0 und —6° entspricht, der

---

[1]) van't Hoff, Vorlesungen über theoretische und physikalische Chemie, 2. Aufl. 1, 224 (1901). E. Cohen, Vorträge für Ärzte, S. 43 (1901).

[2]) Clausen, Landwirtsch. Jahrb. 19, 892 (1890).

[3]) Godlewski, Arbeiten d. botanischen Instituts in Würzburg, 1, 343 (1872).

[4]) Gabrielle Matthaei, Phil. Trans. Roy. Soc. B, 197, 47 (1904). Vgl. Kanitz, Zeitschr. f. Elektrochemie 1905, Nr. 42.

Digitized by Google

etwa zehnmal größer ist als zwischen 0 und 37. Oberhalb letzterer Temperatur sinkt die Assimilation wieder mit steigender Temperatur, bis das Blatt stirbt. Das beruht offenbar auf einer Vernichtung der Funktionen des Chlorophylls bei sehr niedriger und sehr hoher Temperatur.

Ähnliche Bemerkungen lassen sich an Beobachtungen von Hertwig[1]) und Karl Peter[2]) knüpfen, die das Wachstum tierischer Eier nach ihrer Befruchtung betreffen. Die Entwicklung dieser Eier wurde durch Beobachtung der Zellteilung verfolgt, die bei höherer Temperatur viel schneller vor sich geht als bei niederer. Auch chemische Einflüsse, so besonders ein geringer Zusatz von Hydroxylionen zum Seewasser, sind oft wirksam. Die Eier von Arbacia entwickeln sich in Seewasser, das 2 ccm 0,1 n-Alkali auf 100 ccm enthält, ein wenig schneller, als ohne Alkalizusatz. Ein äquivalenter Betrag von HCl verzögert die Entwicklung.[3]) Die Zunahme (J) bei einer Erhöhung der Temperatur von 10° und der entsprechende Wert von μ sind hier aufgezeichnet. Die Zahlen gelten für eine mittlere Temperatur von etwa 16°.

Eier von Echinus microtuberculatus	Erstes Stadium	J = 2,29	μ = 13700
„ „ „ „	Spätere Stadien	2,03	11700
„ „ Sphaerechinus granularis	Erstes Stadium	2,30	13800
„ „ „ „	Spätere Stadien	2,08	12100
„ „ Rana fusca (Hertwig)	Erstes Stadium	2,23	13300
„ „ „ „ „	Spätere Stadien	3,34	20000

Wie wir sehen, ist μ ganz von derselben Größenordnung wie bei der Produktion und Assimilation von Kohlensäure durch grüne Pflanzen. Weiter nimmt bei niedrigen Temperaturen (3—5°) das μ der Froscheier sehr hohe Werte an, etwa zehnmal höhere als die oben angegebenen, und bei Temperaturen über 37° wird der Lebensprozeß durch Temperatursteigerung behindert. Ähnlich verhält es sich, nach Beobachtungen von Charles Snyder[4]) mit den Schlägen des Herzmuskels der pazifischen Schildkröte (Clemmys marmorata). Er beobachtete folgende Werte für die Anzahl Herzschläge pro Minute:

---

[1]) Hertwig, Archiv f. mikroskopische Anatomie (1898).

[2]) Karl Peter, Archiv f. Entwicklungsmechanik, **20**, 130 (1905).

[3]) J. Loeb, ebenda, **7**, 631 (1898). Vgl. oben den Einfluß von Basen und Säuren auf die Zersetzung von Lysinen S. 28—29.

[4]) Charles D. Snyder, University of California publications, Physiology **2**, 125 (1905).

Digitized by Google

Temp.:	0	2,5	5	10	15	20
Zahl:	0,75	3,2	4,9	7,8	9,7	20,7
dgl. berechn.:	2,4	3,2	4,2	7,0	11,4	18,5
Temp.:	25	30	35	37,5	50	
Zahl:	27,3	46	48,6	48,2	43,3	
dgl. berechn.:	29,3	46	71	87,7	240	

μ ist gleich 16060. Aus den Zahlen geht hervor, daß die Lebenstätigkeit des Herzens ein Optimum hat. Es hängt das wahrscheinlich mit Veränderungen zusammen, die bei etwa 0° und 50° im Protoplasma vor sich gehn; bei letzterer Temperatur tritt Koagulierung ein.[1]) Daher fallen die berechneten Werte mit den beobachteten nur innerhalb eines bestimmten Intervalls, 2,5—30°, zusammen. Die rasche Zunahme in der Gegend des Gefrierpunkts ähnelt sehr dem Befund bei den zwei andren Lebensvorgängen, von denen oben die Rede war.

Ein andrer von lebenden Zellen hervorgerufener Vorgang von hoher praktischer Bedeutung ist die Erzeugung von Alkohol und Kohlensäure aus Glukose durch Hefezellen. Dieser Prozeß ist sehr gründlich von Aberson[2]) untersucht worden. Er fand, daß die Henrische Formel für diese Reaktion gilt, wie aus folgenden Zahlen ersichtlich ist, in denen die Glukosemenge (A — x) mit Hilfe des Polarimeters bestimmt ist. A ist die Anfangskonzentration, (A — x) diejenige nach t Minuten. Die Temperatur der ersten Reihe ist 7,5°, die der zweiten 29°.

Alkoholerzeugung mittels Hefe.

t	A — x	$x = \frac{10^5}{t} \log \frac{A+x}{A-x}$	t	A — x	$x = \frac{10^5}{t} \log \frac{A+x}{A-x}$
0	30,7	—	0	30,5	—
43	29,9	26,3	41	28,3	76,5
107	28,7	26,5	86	25,8	78,5
196	27,1	26,1	149	22,6	77,3
269	25,7	26,5	240	18,2	77,2
393	23,5	26,4	300	15,8	76,1
432	22,8	26,5	357	13,5	76,5
512	21,4	26,5	493	11,7	77,5
590	20,5	26,3	514	9,6	76,5
613	19,7	26,5	529	8,1	78,1
790	17,1	26,2	752	4,1	76,0

Die Mittelwerte sind 26,85 und 77. Daraus können wir den Wert von μ zu 15607 berechnen. Mit Hilfe dieses Wertes berech-

[1]) Loeb, Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen, S. 155 (1906).

[2]) Aberson, Receuil des travaux chim. d. Pays-Bas 22, 78 (1903).

Digitized by Google

nete Aberson seine andren Versuche und fand eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit den Beobachtungen. Als Beispiel zitiere ich folgende Zahlen:

Temp.	x beob.	x ber.
15,4	31,2	31,2
21,0	55,6	52,4
27,0	90,0	89,2
32,0	139,8	136,8

Häufig vermehrte sich die Hefemenge während des Versuches, es wurde dann eine entsprechende Korrektion angebracht. Die Menge sowohl der Glukose wie der Reaktionsprodukte war von Einfluß auf die Konstante, woraus die Abweichung der Reaktionsgeschwindigkeit von der für monomolekulare Reaktionen erklärt werden kann.

Die Bildung von Alkohol und Kohlensäure, die Pasteur für eine Eigentümlichkeit der lebenden Zelle angesehen hatte, ist dies nicht, wie Buchner gezeigt hat, sondern kann ebensogut mit toten Hefenzellen oder einem Extrakt daraus, der Zymase genannt wird, durchgeführt werden. Mit toten Hefezellen machte Herzog[1]) und mit Zymase Euler[2]) Versuche, in letzterem Falle verläuft die Reaktion im homogenen Medium. Euler verfolgte ihren Lauf durch Messung der entwickelten Kohlensäure, sowie mit dem Polarimeter. Die Glukosemenge betrug 20 ccm 1 n-Lösung. Die angewandte Zymasemenge war in der ersten Reihe 3,6 g, in der zweiten 1,2 g.

Alkoholerzeugung aus Glukose mittels Zymase:

Beobachtung der entwickelten CO_2-Menge.			Beobachtung mit dem Polarimeter.		
t (Min.)	a − x	$x=\frac{10^4}{t}\log\frac{a}{a-x}$	t (Min.)	a − x	$x=\frac{10^4}{t}\log\frac{a}{a-x}$
0	790	—	0	1075	—
198	709	2,37	81	1018	2,95
237	700	2,21	124	990	2,90
323	672	2,17	224	930	2,81
413	644	2,15	324	877	2,73
			355	860	2,73
			381	851	2,67
			406	841	2,63
			730	700	2,55

Hier finden wir eine langsame Abnahme der x-Werte und nicht eine Zunahme, in welchem Falle die Henrische Formel benutzt

[1]) Herzog, Hoppe-Seylers Zeitschr. 37, 149.
[2]) Euler, ebenda, 44, 53 (1905).

Digitized by Google

werden könnte. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Übereinstimmung zwischen Henris Formel und Abersons Messungen auf einer durch die Lebensprozesse der Hefezellen verursachten Störung beruht.

Euler hat ferner einige Komplikationen beobachtet, die neue Versuche erfordern, ehe sie erklärt werden können. Die Reaktionsgeschwindigkeit wächst schneller als die Konzentration des Enzyms, und nicht proportional einer einfachen Potenz. Die zersetzte Menge wächst nicht mit der Konzentration des Zuckers, sondern zeigt im Gegenteil eine Abnahme, wenn diese zunimmt.

Das Studium der Reaktionsgeschwindigkeiten in heterogenen Systemen weist darauf hin, daß sie sich in dieser Hinsicht nahezu ebenso wie homogene Systeme verhalten. Diese Beobachtung ist oft gemacht worden, wo es sich um Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen handelte. Es beruht das darauf, daß nach den üblichen experimentellen Anordnungen die Diffusion so rasch verläuft, daß sie den chemischen Prozeß nicht stört. Wenn Kapillarröhren angewandt werden, so kann man dies nicht behaupten, daher sollte die Methode der Mettschen Röhren nicht zu quantitativen Mengen benutzt werden.

Auch der Einfluß der Temperatur ist bei diesen Reaktionen von derselben Größenordnung, wie bei Prozessen, bei denen verschiedene Stoffe in homogenen Systemen miteinander reagieren. Bemerkenswert ist der niedrige Wert bei der Hämolyse mittels Natriumoleat ($\mu = 3800$).

Die Agglutination der Erythrocyten mittels Mercurichlorid und Ricin ergibt nahezu gleiche μ-Werte (17900 und 17200), und die μ-Werte der beiden verschiedenen Bakterio-Agglutinine sind nicht sehr untereinander verschieden ($\mu = 30100$ bei Coli-Agglutinin, $\mu = 37200$ bei Typhus-Agglutinin). In der Nähe dieses Wertes liegen auch die der Hämolysine bakteriellen Ursprungs (Streptolysin $\mu = 31900$, Vibriolysin $\mu = 27300$; bei Tetanolysin war die Reaktionszeit zu lang, um einen auch nur annähernd richtigen Wert von μ zu geben). An diese Werte schließen sich die höchsten für die hämolytische Wirkung von Säuren und Basen erhaltenen an (Ammoniak $\mu = 27000$, Propionsäure $\mu = 25000$). Das Nähere über diese μ-Werte ist schon oben diskutiert worden (vgl. S. 73—77).

Andere μ-Werte, die in diesem Kapitel abgeleitet sind, mögen hier eine Zusammenstellung finden. Sie sind:

Tryptische Verdauung von Casein	$\mu = 7400$
Verseifung von Eidotteremulsion durch Magensaft	$\mu = 13600$
Spontane Zersetzung des lipolytischen Enzyms in Ricinus	$\mu = 26000$

Digitized by Google

Lipolyse durch Ricinussamen	$\mu = 7540$
Ausatmung von Kohlensäure durch Pflanzen	$\mu = 14800$ (Mittel)
Alkoholproduktion durch Hefezellen	$\mu = 15607$
Assimilationsprozeß bei Pflanzen	$\mu = 12000$
Zellteilung in befruchteten Eiern	$\mu = 14100$ (Mittel)
Herzschlag bei der pazifischen Schildkröte	$\mu = 16060$

Von diesen Prozessen gehen wahrscheinlich die, bei denen das Enzym des Ricinussamens beteiligt ist, in homogenen Systemen vor sich (vgl. oben S. 85).

Im allgemeinen kann man wohl sagen, daß diese μ-Werte von derselben Größenordnung sind wie bei den im vorigen Kapitel behandelten Prozessen in homogenen Systemen, wenn man von den enormen Werten absieht, die häufig bei spontaner (oder durch Basen oder Säuren beschleunigter) Zersetzung von Enzymen vorkommen.

Kapitel 5. Gleichgewichte bei Absorptionsprozessen.

Der einfachste Prozeß von allen, die in dieses Gebiet gehören, scheint die Absorption von Agglutininen durch die entsprechenden Bakterien zu sein. Wenn wir ein Agglutinin zu einer Bakterien-Emulsion setzen, so klumpen die Bakterien zusammen und fallen auf den Boden des Gefäßes. Wenn wir die Flüssigkeit von den abgesetzten Bakterien dekantieren und von neuem ihre agglutinierende Kraft bestimmen, so finden wir, daß sie in hohem Maße abgenommen hat. Wir schließen daher, daß ein großer Teil des Agglutinins von den Bakterien absorbiert worden ist.

Eisenberg und Volk haben diese Erscheinung in ziemlich ausgedehntem Maße studiert. Die folgenden kleinen Tabellen enthalten ihre Resultate, die mit den Seren zweier Pferde, deren einem Typhusbazillen und deren andrem Choleravibrionen injiziert waren, erhalten wurden. Diese agglutininhaltigen Seren wurden in wechselnder Konzentration — dargestellt durch Verdünnung mit physiologischer Salzlösung — in Kontakt mit konstanten Mengen von Typhusbazillen- oder Choleravibrionen-Emulsion gebracht. Die zugesetzte Agglutininmenge steht in der Kolumne unter T, die von den Bakterien absorbierte Menge ist C genannt, und die in der Lösung verbleibende Menge ist $B_{beob.}$ genannt. Offenbar ist $B_{beob.} + C = T$. In der nächsten Kolumne ist eine Zahl $B_{ber.}$ aufgeführt, die auf eine unten angegebene Weise berechnet ist.

Digitized by Google

Absorption von Typhusagglutinin durch Typhusbazillen.

T	C	$B_{beob.}$	$B_{ber.}$	x	
2	2	0	0,02	—	
20	20	0	0,7	—	
40	40	0	2,1	—	
200	180	20	19,7	24,4	
400	340	60	52,9	22,6	
2 000	1 500	500	478	23,7	Mittel 24,7
10 000	6 500	3500	3890	28,2	
20 000	11 000	9000	9160	25,4	

Absorption von Choleraagglutinin durch Choleravibrionen.

T	C	$B_{beob.}$	$B_{ber.}$	x	
2	2	0	0,03	—	
20	20	0	1,0	—	
40	38	2	2,8	24	
67	60	7	6	16,4	
200	120	80?	27	(6,5?)	Mittel 19
2 000	1 300	700	620	16,5	
11 000	6 500	4 500	5 260	23,9	
20 000	10 000	10 000	10 750	21,5	

Wie aus diesen Zahlen zu ersehen ist, wird eine kleine Menge Agglutinin (nahezu) vollständig absorbiert; $B_{beob.}$ wird gleich 0 gefunden. In der Tat gestattete die Beobachtungsmethode nicht, Werte von B unter $B = 1$ zu beobachten. Bei weiterem Zusatz von Agglutinin nimmt der absorbierte Anteil beständig ab, bis am Schluß der absorbierte Teil nicht größer als der nicht absorbierte ist.

Es ist bisher oft angenommen worden, daß das Agglutinin chemisch von den Bakterien gebunden wird. Um diese Idee durchzuführen, müssen wir annehmen, daß die entstehende Verbindung ziemlich dissoziierbar ist. Denn sonst wäre die beobachtete Auswaschung des Agglutinins aus dieser Verbindung nicht zu erklären. Ferner müßte die Absorption des Agglutinins vollständig sein, bis Sättigung erreicht wäre, und von da ab müßte nur eine ganz geringe Zunahme, die der physikalischen Absorption zuzuschreiben wäre, zu beobachten sein.

Aber auch, wenn wir die Verbindung als in hohem Maße dissoziierbar betrachten, so müssen wir erwarten, daß die gebundene Menge C des Agglutinins mit steigender Konzentration B (und T) zu einem Grenzwert steigt. Wie Eisenberg und Volk bemerken, lassen ihre Versuche nichts von einem solchen Grenzwert erkennen. Auch die Hypothese, daß das Agglutinin aus vielen verschiedenen Agglutininarten mit verschiedener Bindungskraft besteht, hilft über diese Schwierigkeit nicht hinweg.

Zur Stütze der Hypothese, daß die Agglutination die Folge einer

Digitized by Google

chemischen Bindung ist, bringt Joos einige Versuche bei, die den allmählichen Zusatz von Agglutinin zu einer Typhusbazillen-Emulsion behandeln. Er versuchte, wie groß die kleinste Agglutinindosis ist, die alle Bakterien der Emulsion zu agglutinieren vermag. Darauf setzte er einen Teil dieser Menge zu einer ähnlichen Emulsion; die Agglutination war unvollständig. Er zentrifugierte die Lösung und schied so die agglutinierten Bakterien ab. Dann setzte er eine neue Portion Agglutinin zu der Lösung usf., bis alle Bakterien agglutiniert waren. Die gesamte Menge des Agglutinins, das auf diese Art fraktionsweise zugesetzt wurde, ergab sich gleich der Menge, die nötig ist, um alle Bakterien auf einmal zu agglutinieren. In Anbetracht der großen Versuchsfehler bei solchen Beobachtungen scheint diese Schlußfolgerung keinen hohen Grad der Genauigkeit zu besitzen. Und wäre dies auch der Fall, so ist es sehr wahrscheinlich, daß die von den ersten Fraktionen abgeschiedenen Bakterienmengen ziemlich klein waren, und unter diesen Umständen ist offenbar zu erwarten, daß die totalen Agglutininmengen bei den beiden Experimenten nahezu dieselben sein müssen.

Wenn man Eisenbergs und Volks Zahlen betrachtet, so sieht man sogleich, daß zwischen der absorbierten Menge C und der freien Menge B des Agglutinins eine Beziehung besteht. Diese Beziehung läßt sich durch eine sehr einfache mathematische Formel ausdrücken, nämlich:

$$C = \varkappa B^{2/3}$$

Mit Hilfe dieser Formel sind die berechneten Zahlen $B_{ber.}$ gefunden. Sie stimmen innerhalb der Versuchsfehler sehr gut mit den Beobachtungen überein, wie auch Dr. Eisenberg bestätigt hat. Die einzige Beobachtung, die keine befriedigende Übereinstimmung zwischen berechnetem und beobachtetem Wert zeigt, ist die in der zweiten Reihe, wo $B_{beob.} = 80$, $B_{ber.} = 27$. Hier sagen Eisenberg und Volk selbst in ihrer ursprünglichen Abhandlung, daß die Beobachtung durch einen zufälligen Fehler entstellt sein muß.

Die physikalische Deutung der Formel ist sehr einfach. Sie besagt, daß die Agglutininmoleküle sich zwischen den Lösungsmitteln verteilen, nämlich zwischen den Bakterienzellen und der umgebenden Flüssigkeit, und daß aus zwei Molekülen des freien Agglutinins drei Moleküle des absorbierten Agglutinins entstehen.

Die Erscheinungen hier erinnern an Ransoms Versuche, in denen sich zeigte, daß Cholesterin ein Lösungsmittel für Saponin ist, und daß die Anwesenheit des Cholesterins in den roten Blutkörperchen es ermöglicht, daß die hämolytische Substanz Saponin in diese

Digitized by Google

eintritt und sie vergiftet, so daß sie ihren Farbstoff, das Hämoglobin, verlieren. Ganz ebenso enthalten die Bakterienzellen eine Substanz, die ein gutes Lösungsmittel für das entsprechende Agglutinin ist und ihm gestattet, zum größten Teil in die Bakterien überzugehen. Das Molekulargewicht des Agglutinins in diesem Lösungsmittel ist nur zwei Drittel des Molekulargewichts in der umgebenden Flüssigkeit, der physiologischen Salzlösung.

Dies Verhalten der Agglutininmoleküle in den beiden Lösungsmitteln erinnert sehr an das Verhalten von Benzoesäure in zwei verschiedenen Lösungsmitteln, Wasser und Benzol. In wäßriger Lösung beträgt das Molekulargewicht der Benzoesäure nach Bestimmungen des Gefrierpunkts 122, entsprechend der Formel C_6H_5COOH, in Benzollösung dagegen ist ihr Molekulargewicht doppelt so groß. Wenn wir Benzoesäure in Wasser auflösen und die Lösung mit Benzol schütteln, besteht daher folgende Beziehung zwischen der Konzentration C_a in wässeriger und der Konzentration C_b in Benzollösung:

$$C_a = \varkappa C_b^{1/2}$$

wo $\varkappa$ ein konstanter Faktor ist. Nernst hat diese Formel verifiziert, indem er Versuche über die Verteilung von Benzoesäure zwischen Wasser und Benzol anstellte.

Die große Geschwindigkeit der Absorption ist, wie schon erwähnt, in guter Übereinstimmung mit unserer Erklärung.

Eine schwer zu erklärende Sache ist die Spezifität der Agglutinine. Das Agglutinin, das durch Einspritzung von Typhusbazillen in dem Blut eines Tieres erzeugt ist, wird nur von Typhusbazillen, nicht von andren Bakterien absorbiert, z. B. nicht von Choleravibrionen und vice versa. Wahrscheinlich sind die Zellmembranen der Typhusbakterien nur für Typhusagglutinin durchlässig und nicht für andre Agglutinine.

Normales Serum enthält verschiedene Agglutinine gegen Bakterien und rote Blutkörperchen. Durch Schütteln mit den entsprechenden Bazillen können die verschiedenen Agglutinine voneinander getrennt werden. So emulsionierte Malkoff Ziegenserum, das rote Blutkörperchen von Menschen, Kaninchen und Tauben agglutiniert, mit roten Blutkörperchen von Kaninchen. Das zentrifugierte Serum hatte seine agglutinierende Kraft in bezug auf Kaninchenblutkörperchen verloren, aber für die beiden andren Arten behalten.[1])

Die Agglutinine verlieren spontan ihre agglutinierende Kraft, und zwar bei hoher Temperatur viel schneller als bei niedriger. Auch Behandlung mit verschiedenen chemischen Agenzien, wie Salzsäure

[1]) Malkoff, Deutsche med. Wochenschr. 1900.

Digitized by Google

und andren Säuren, Basen, Formol und Harnstoff schwächt sie. Die näheren Umstände sind nicht genauer erforscht.

Ebenso wie Agglutinine von Bakterien und roten Blutkörperchen absorbiert werden, ebenso werden auch verschiedene andre Substanzen von diesen Zellen absorbiert und wahrscheinlich würden sich hier überall analoge Gesetzmäßigkeiten zeigen. So werden Tetanolysin, Ricin und die verschiedenen Immunkörper von roten Blutkörperchen absorbiert und es scheint ein allgemeines Gesetz zu sein, daß nur diejenigen Stoffe eine Wirkung auf diese Zellen ausüben, die von ihnen absorbiert werden. Ob die Zellen leben oder tot sind, das scheint, wie wir bei der Agglutinin-Absorption bemerkten, keinen großen Einfluß zu haben, wenn nur die Tötung der Zellen vorsichtig erfolgt ist, so daß keine größeren chemischen Veränderungen vor sich gegangen sind.

Prof. Morgenroth und ich[1]) untersuchten die Absorption eines Immunkörpers, der dargestellt war, indem rote Blutkörperchen aus Ochsenblut einem Kaninchen subkutan eingespritzt wurden. Verschiedene Lösungen des Immunkörpers — ihre Stärke, in willkürlichen Einheiten, ist in der Tabelle unter T angegeben — wurden mit einer konstanten Menge von Erythrocyten aus Ochsenblut behandelt, und zwar etwa eine Stunde lang bei niederer Temperatur, und dann zentrifugiert. Die zentrifugierte Flüssigkeit wurde auf ihren Gehalt an Immunkörper B geprüft, indem sie mit normalem Meerschweinchenserum vermischt wurde und die hämolytische Kraft des erzeugten Hämolysins gemessen wurde. Die Differenz C war von den roten Blutkörperchen absorbiert worden. Hinter den beobachteten Zahlen $B_{beob.}$ der freien Menge des Immunkörpers stehen andre Zahlen $B_{ber.}$, gewonnen mit Hilfe derselben Formel, die sich für die Agglutinine gültig erwiesen hat. Die Konstante $\varkappa$ der Formel wurde gleich 18,3 gesetzt.

Absorption eines Immunkörpers durch rote Ochsenblutkörperchen.

T	C	$B_{beob.}$	$B_{ber.}$
250	226	24	39
330	275	55	57
670	500	170	151
1 330	850	480	376
2 700	1 710	990	942
5 000	3 070	1 930	2 050
10 000	5 800	4 200	4 800
16 700	7 820	8 880	8 870
33 000	13 900	19 100	19 700

[1]) vgl. Arrhenius, Arb. d. kais. Gesundheitamtes Bd. 20, 10 (1904). Hygiea, Bd. 66.

Digitized by Google

Wie man aus den Zahlen sieht, ist die Übereinstimmung zwischen beobachteten und berechneten Werten ebensogut wie bei den Agglutininen und durchaus innerhalb der möglichen Beobachtungsfehler. Die gleiche physikalische Erklärung gilt offenbar für beide Erscheinungen.

Ähnliche Versuche hat Morgenroth mit dem Serum einer Ziege durchgeführt, die Einspritzungen von Blutkörperchen eines Schafes erhalten hatte. Die gefundenenen Werte sind in der folgenden Tabelle mit den berechneten ($\varkappa = 39{,}5$) zusammengestellt.

Absorption eines Immunkörpers durch Schaferythrocyten.

T	C	$B_{beob.}$	$B_{ber.}$	T	C	$B_{beob.}$	$B_{ber.}$
200	189,5	10,5	10,5	3200	2400	800	550
400	374	26	28,8	6400	5230	1170	1420
800	723	77	78,4	12800	9420	3380	2570
1600	1384	216	211				

In einigen neuen Untersuchungen über die Absorption von Coli-Agglutinin im Körper von Bacillus coli hat Madsen festgestellt, daß nicht nur die Konstante $\varkappa$, sondern auch der Exponent n in der Gleichung $C = \varkappa B^n$ bei verschiedenen Versuchen verschiedene Werte annehmen kann. n liegt immer ziemlich nahe bei 1, manchmal steigt es darüber hinaus, z. B. in einem Falle ergab $n = 1{,}25$. Eine nähere Untersuchung über die Ursache dieser Schwankungen erscheint sehr wünschenswert.

Dieser Fall hat eine gewisse theoretische Bedeutung. Ganz neuerdings ist häufig die Ansicht ausgesprochen worden, daß die Absorption des Agglutinins durch Bakterien der sogenannten Adsorption analog ist, wie sie von Kohle auf gelöste Stoffe oder von organischen Geweben auf Farbstoffe ausgeübt wird. Bordet hat diese Annahme zuerst ausgesprochen, und neuerdings hat sie Wilh. Biltz vertreten. Biltz stellt fest, daß bei den bisher theoretisch sehr wenig aufgeklärten Adsorptionsprozessen n stets kleiner als 1 ist. Bei der Adsorption durch Kohle ist es, nach Schmidt, 0,25. Wenn daher n zuweilen 1 überschreitet, wie Madsen findet, so müssen wir die Adsorptionshypothese aufgeben. Biltz, Much und Siebert schüttelten Typhusagglutinin zwei Stunden lang mit folgenden kolloidalen Körpern: Kieselsäure, Eisen-, Zirkon- und Thoriumhydroxyd. Es wurde gefunden, daß die Kieselsäure einen merklichen, die drei andren Substanzen einen viel größeren zerstörenden Einfluß auf das Agglutinin hatten. Daraus scheint hervorzugehen, daß wir es hier mit einem echten chemischen Vorgang zu tun haben, was nicht zu verwundern ist, da viele verschiedene Substanzen Agglutinin zerstören. Bei Adsorptionen läßt sich aber im allgemeinen zeigen, daß der adsorbierte Körper,

Digitized by Google

z. B. der Farbstoff, an oder in der adsorbierenden Substanz vorhanden ist; oft läßt er sich durch Auswaschen entfernen. Die Verfasser haben vergebens versucht, Tiere zu vergiften, indem sie ihnen Eisenhydroxyd einspritzten, das mit Diphtheriegift oder Tetanospasmin geschüttelt war, was diese Gifte in derselben Weise wie die Agglutinine schwächt. Wenn diese Gifte adsorbiert worden wären, wie die Agglutinine von den Bakterien und Erythrocyten (vgl. S. 23 u. 24), d. h. reversibel, so hätte sich eine kräftige Giftwirkung bei den Tieren zeigen müssen. Aber keine Spur der erwarteten Wirkung war zu beobachten. Biltz, Much und Siebert kommen zu dem Schlusse, daß die Adsorptionshypothese unhaltbar ist.

Sie nehmen daher eine Idee auf, die gelegentlich von Nernst zur Erklärung der Neutralisation von Toxinen durch Antikörper geäußert worden ist. Diese Idee ist von der Behrings nicht sehr verschieden. Nehmen wir an, wir hätten fein verteiltes kolloidales Platin (Bredigs „anorganisches Ferment") und Wasserstoffsuperoxyd. Dann kondensiert sich das Superoxyd an den feinen Metallteilchen und zersetzt sich dort. Das entspräche der Kondensation eines Toxins, z. B. des Ricins, an den kolloidalen Teilchen seines Antikörpers, und seiner darauf folgenden Zersetzung. Das Antiricin selbst würde langsam von dem Ricin angegriffen werden, genau wie das Platin, wenn es oxydierbar wäre, von dem Wasserstoffsuperoxyd. Diese Erklärung ist unvereinbar mit der Tatsache, daß das Ricin zurückgewonnen werden kann, nachdem es „neutralisiert" worden ist. Die Neutralisation kann daher nicht auf einer wirklichen Zerstörung beruhen. Es scheint, als ob die Anwälte und Anhänger dieser Idee, die Schulen von Nernst und Ehrlich, ein starkes Gefühl dafür hatten, daß diese Theorie mit der Erfahrung in Konflikt kommen würde, sobald sie ausgearbeitet würde. Sie paßt offenbar gut auf die Versuche, bei denen Gifte mit kolloidalen Hydroxyden geschüttelt wurden (abgesehen davon, daß diese Substanzen von den Giften nicht chemisch angegriffen werden), aber sie verträgt sich nicht mit unsrer Erfahrung über das Verhalten von Agglutininen.

Es sei auch betont, daß sich die Antitoxinlösungen nicht wie Suspensionen verhalten, wie man aus ihrem Diffusionsvermögen sieht, das den Suspensionen fehlt.

Wir kommen jetzt zu einer andren Erscheinung, auf die wir bei der Beschäftigung mit einigen Agglutininarten stoßen, z. B. solchen, die durch Säuren oder andre Chemikalien, oder Hitze, geschwächt sind. Diese veränderten Agglutinine zeigen eine Zunahme ihrer agglutinierenden Fähigkeit, bis ein Maximum der Agglutination erreicht

Digitized by Google

ist. Von da ab vermindern neue Zusätze von Agglutinin den Effekt und bei einer hohen Konzentration des Agglutinins hört die Agglutination auf. Ein ähnliches Verhalten ist für viele Salze charakteristisch. Ohne die Anwesenheit von etwas Salz in der Lösung tritt keine Agglutination auf, und dasselbe gilt wieder für sehr große Salzkonzentrationen. Bei steigender Konzentration des Salzes über das Optimum hinaus werden wachsende Agglutininmengen zur Erzeugung der Agglutination gebraucht, und überschreitet die Salzkonzentration einen bestimmten Grenzwert, so verschwindet die Agglutination. Bei kleinen Salzzusätzen scheint die agglutinierte Menge der Salzmenge proportional zu sein, was die meisten Hypothesen, die über die Natur der Agglutination aufgestellt sind, erwarten lassen, nicht nur die chemische, wie Joos glaubt.

In der Immunitätslehre finden wir viele analoge Fälle, wo bei bestimmter Konzentration der wirksamen Substanz Maxima oder Minima des Effektes beobachtet werden. Eines der auffälligsten Beispiele bietet die Injektion einer Mischung von Botulinusgift, das von Bacillus botulinus erzeugt wird, und seines Antikörpers, das in dem Blutserum der mit dem Gift geimpften Tiere enthalten ist. Madsen verwandte z. B. eine Mischung von 0,1 ccm Gift mit 0,0013 ccm Antitoxin. Die Injektion zehn solcher Dosen in ein Meerschweinchen (von 250 g Gewicht) war wirkungslos. Zwei Dosen gaben eben eine Spur von Vergiftung, die durch eine besondere Mattigkeit des Tieres kenntlich war. Eine Dose erzeugte Mattigkeit während 4—7 Tagen. Injektionen zwischen 0,013 und 0,5 Dosen hatten letale Wirkung, und die maximale Toxicität zeigte sich bei 0,1 Dose, indem das damit behandelte Tier schon nach 2 Tagen starb. 0,01 Dose war nicht mehr tödlich, bewirkte aber Mattigkeit während 7 Tagen, und 0,003 Dose noch eine Spur Mattigkeit während eines Tages.

Ein andres, ähnliches Beispiel, wo ein Minimum und ein Maximum des Effektes auftritt, ist die Hämolyse mittels Saponins, eines Extraktes aus der Saponariawurzel (Madsen und Walbum). 8 ccm einer 1 prozentigen Emulsion von Erythrocyten aus Pferdeblut wurden mit den folgenden Quantitäten einer 0,02 prozentigen Saponinlösung und soviel physiologischer Kochsalzlösung gemischt, daß das Gesamtvolumen der Mischung 10 ccm betrug. Die Mischung verweilte 3 Stunden lang in einem Thermostaten von 37° und wurde darauf im Eisschrank abgekühlt. Der Grad der Hämolyse in Prozenten wurde am folgenden Tage beobachtet, wenn die unangegriffenen Erythrocyten sich abgesetzt hatten.

Saponinmenge in ccm	1	0,7	0,5	0,4	0,3	0,25	0,2	0,17	0
Hämolyse in Prozenten	35	16	18	30	36	36	45	41	0

Digitized by Google

Ähnliche Beobachtungen wurden bisweilen bei Mischungen von Saponin und Cholesterin gemacht, welch letzteres als Antitoxin gegen Saponin wirkt.

Auch Tetanolysin (Madsen und Walbum) gibt manchmal solche Maxima der Wirkung bei bestimmter Konzentration, wenn die Wirkungszeit verhältnismäßig kurz ist. Bei längerer Einwirkung verschwindet das Maximum. Dieses Maximum scheint daher der Reaktionsgeschwindigkeit anzugehören und nicht dem schließlichen Gleichgewicht. Vielleicht würde sich Saponin ebenso verhalten, wenn seine Wirkung über eine genügende Zeit ausgedehnt werden könnte.

Erscheinungen dieser Art will man oft auf die Gegenwart zweier Substanzen von entgegengesetzter Wirkung in der angewandten Mischung zurückführen. So nimmt man an, daß mit Säuren usw. vorbehandeltes Agglutinin außer dem wirklichen Agglutinin eine zweite, Agglutinoid genannte Substanz enthält, die die Agglutination hindert. Bei größerer Konzentration, nimmt man weiter an, absorbieren die Bazillen hauptsächlich das Agglutinoid und nicht das Agglutinin; bei niederer Konzentration absorbieren sie beides. Diese Erklärung scheint mir nicht weiter zu führen, als die einfache Feststellung der Tatsache, und sich der Erinnerung viel schwerer einzuprägen. Da scheint es einfacher, anzunehmen, daß die wirksame Substanz zwei verschiedene Wirkungen auf die Zellen ausübt, von denen die eine, die bei höherer Konzentration in Erscheinung tritt, die andre, die bei niederen Konzentrationen vorwiegt, an der Entfaltung hemmt. Ähnlich gibt z. B. Alkali in einer Aluminiumchloridlösung einen Niederschlag von Tonerdehydrat, der bei weiterem Alkalizusatz in Lösung geht.

In einer Abhandlung über die Eigenschaften der Kolloide erinnert Biltz[1]) an die Tatsache, daß im allgemeinen positive Kolloide (die mit dem elektrischen Strom im selben Sinne wie Kationen wandern) negative Kolloide (die im Sinne der Anionen wandern) ausfällen. Das erinnert etwas an die Spezifität der Agglutinine. Wie wir weiter sehen werden, nahm Henri dieselbe Idee auf, fand sie aber später durch Versuche an Agglutininen nicht bestätigt. Ferner fand Biltz Konzentrations-Optima bei der Fällung der Kolloide. Z. B. gaben 1,62 mg Zirkonoxyd mit 1,4 mg Gold in kolloidaler Lösung eine reichlichere Fällung als eine größere oder kleinere Menge. 3,25 mg ZrO_2 gaben überhaupt keine Fällung mehr. Ebenso verhielten sich 4 mg Thoriumoxyd (als kolloidales Hydrat) gegen eine kolloidale Lösung von 5,5 mg Sb_2S_3.

[1]) Biltz, Göttinger Nachrichten, math.-phys. Klasse 1904, 1. Zeitschr. f. phys. Ch. 48, 615 (1904). vgl. Hardy, Zeitschr. f. phys. Ch. 33, 391 (1900).

Digitized by Google

Hierin haben die Kolloide Analoga unter den gewöhnlichen anorganischen Substanzen in Lösung; analoge Wirkungen sind als besonders charakteristisch bei den Präzipitinen beobachtet worden, und wir werden dort auf diese besondere Frage zurückkommen.

Über den Einfluß von Salzen auf die Agglutination besitzen wir eine gründliche Untersuchung von Bechhold.[1]) Er benutzte Typhus-Bakterien, die in Bouillon kultiviert, mit Formol getötet und durch wiederholte Emulsion in destilliertem Wasser und Zentrifugierung gewaschen worden waren. Diese Bakterien wurden emulsioniert und 1 ccm der Emulsion in einem Probierröhrchen mit 1 ccm der zu prüfenden Salzlösung zusammengebracht. Das Probierröhrchen wurde auf 24 Stunden in einen Brutschrank von 37° gestellt und dann sein Inhalt geprüft. Der Grad der Agglutination wurde geprüft, indem man durch das Röhrchen auf ein bedrucktes Papier sah und in einer der folgenden vier Bezeichnungen ausgedrückt: 1. Flüssigkeit völlig klar; vollständige Agglutination. 2. Die meisten Bakterien abgesetzt, aber die Flüssigkeit nicht vollkommen klar; starke Agglutination. 3. Einige Bakterien abgesetzt und zusammengeballt, keine Klärung der Flüssigkeit; schwache Agglutination. 4. Keine merkliche Veränderung der Flüssigkeit; keine Agglutination.

Bei einigen Versuchen wurden die Bakterien in natürlichem Zustand angewandt. Bei andren waren sie vorbehandelt mit agglutininhaltigem Serum, Bleinitrat, Ferrisulfat, Alkohol, Säuren, Uranylacetat, alles Stoffe, die agglutinierend wirken, darauf gründlich gewaschen, bis das Wasser keine Reaktion auf die agglutinierende Substanz mehr gab; die so in verschiedener Weise vorbehandelten Bakterien mögen Sero-, Blei-, Eisen-, Alkohol- und Uranyl-Bakterien genannt werden. Diese Bakterien waren verändert, so daß sie sich anders gegen Salzlösungen verhielten als ursprünglich. Die Blei-Bakterien wurden durch Schwefelwasserstoff schwarz gefärbt, was zeigt, daß sie trotz des Waschens Blei zurückgehalten hatten. Zum Vergleich prüfte Bechhold auch das Verhalten von Mastix-Emulsionen, die entweder durch Zusatz einiger Tropfen einer alkoholischen Lösung dieses Stoffes zu Wasser bereitet waren (sogenannter α-Mastix), oder durch Zusatz einiger Tropfen Wasser zu der alkoholischen Lösung (β-Mastix). Die Versuche über die Agglutination dieser Emulsion wurden bei gewöhnlicher Zimmertemperatur angestellt, da bei 37° der suspendierte Stoff sich gelöst hätte. Zunächst wurde ein Einfluß der Reaktionszeit festgestellt. Emulsionen von Sero-Bakterien, ge-

[1]) Bechhold, Zeitschr. f. phys. Ch. 48, 385 (1904).

Digitized by Google

mischt mit 0,05, 0,025 und 0,012 normalen Lösungen von Natriumchlorid und -jodid wurden in 50 bzw. 90 und 120 Minuten vollständig agglutiniert. Gewöhnliche Bakterien werden von diesen Lösungen überhaupt nicht agglutiniert. Von anderen Lösungen werden wieder Sero-Bakterien weniger angegriffen als gewöhnliche, z. B. von 0,0033 n Silbernitrat oder 0,005 n Salzsäure. Nach 15, 50 und 1440 Minuten gaben diese Mischungen folgende Resultate:

	gewöhnl. Bakterien		
	15′	50′	1440′
Behandlung mit 0,0033 n $AgNO_3$	schwache	vollst.	vollst. Agglutination
„ „ 0,005 n HCl	schwache	vollst.	vollst. „

	Sero-Bakterien		
	15′	50′	1440′
Behandlung mit 0,0033 n $AgNO_3$	keine	schwache	vollst. Agglutination
„ „ 0,005 n HCl	keine	schwache	vollst. „

Diese und andere ähnliche Versuche zeigen, daß die Agglutination Zeit erfordert (vgl. S. 77). Weiter ist eine gewisse Konzentration (Grenzwert) der Salzlösung nötig, um eine erkennbare Agglutination zu geben. Die folgende Tabelle gibt die Grenzwerte (in 0,001 n) der Konzentration für verschiedene Salze. Das Zeichen ∞ bedeutet, daß auch die stärksten Lösungen nicht agglutinierten. Die Salzmenge, die für die erste Spur der Agglutination erforderlich ist, hat den höchsten Wert bei α-Mastix, dann folgen β-Mastix und gewöhnliche Bakterien, und zuletzt Sero-Bakterien, die am empfindlichsten gegen Salze sind. Die Salze der Alkalien, Erdalkalien und des Magnesiums haben keine oder sehr schwache Wirkung auf gewöhnliche Bakterien. Die agglutinierende Kraft von Salzen dreiwertiger Metalle ist größer, als von solchen zweiwertiger Metalle. Einen sehr starken Einfluß haben die Säuren, besonders die starken. Das Anion scheint sehr wenig Einfluß zu haben.

Präparat	α-Mastix	β-Mastix	gewöhnl. Bakterien	Sero-Bakterien
KOH	∞	—	∞	∞
NaCl	1000	10	∞	25
NaJ	—	—	—	25
$NaNO_3$	—	—	—	25
Na_2SO_4	—	50	—	50
RbJ	—	—	—	25
$HgNO_3$	1,25	—	1	0,5
$AgNO_3$	125	—	25	1
HCl	10	1,25	1	0,5
H_2SO_4	10	—	1	0,25

Digitized by Google

Präparat	α-Mastix	β-Mastix	gewöhnl. Bakterien	Sero-Bakterien
CH_3CO_2H	500	—	1	1
o-Amidobenzoësäure	—	—	5	5
$Al_2(SO_4)_3$	0,5	—	0,25	0,25
$Al(NO_3)_3$	0,5	—	—	—
$Fe_2(SO_4)_3$	0,5	—	0,5	0,1
$Fe(NO_3)_3$	1	—	—	—
$FeCl_3$	1	—	—	—
$PtCl_4$	10	—	2,5	0,5
$MgSO_4$	100	—	∞	2,5
$Mg(NO_3)_2$	100	—	—	—
$CaCl_2$	50	—	∞	4,5
$Ca(NO_3)_2$	50	—	—	—
$Ba(OH)_2$	50	—	25	25
$BaCl_2$	50	5	∞	5,0
$Ba(NO_3)_2$	50	—	—	—
$ZnSO_4$	100	—	10	1
$Zn(NO_3)_2$	50	—	—	—
$CdSO_4$	25	—	10	1
$Co(NO_3)_2$	50	—	?	2,5
$Ni(NO_3)_2$	50	—	—	2,5
$Ni(C_2H_3O_2)_2$	25	—	25	2,5
$Pb(NO_3)_2$	5	—	2,5	0,1
$Cu(NO_3)_2$	5	—	—	0,5
$CuCl_2$	10	—	2,5	1
$CuSO_4$	10	—	2,5	—
$Cu(C_2H_3O_2)_2$	5	2,5	—	—
$HgCl_2$	∞	—	2,5	0,5

Die einwertigen Salze des Quecksilbers und die des Silbers unterscheiden sich ziemlich beträchtlich von denen anderer einwertiger Ionen. Wahrscheinlich geben sie chemisch nahezu unlösliche Verbindungen mit der Eiweißsubstanz.

Bei anderen Versuchen prüfte Bechhold den Einfluß geringer Zusätze von Gelatine, Serum, Gummi arabicum, Extrakt von Typhus-Bazillen und von Blutegeln auf Mastix-Emulsion. Gelatine hatte keinen Einfluß auf gewöhnliche Bakterien, Sero-Bakterien oder Blei-Bakterien. Die Alkohol-, Säure- und Uranyl-Bakterien haben sonst Eigenschaften, die in der Mitte zwischen gewöhnlichen Bakterien und Sero-Bakterien liegen, aber ihre Agglutination wurde durch Gelatinezusatz herabgedrückt. Wahrscheinlich überzieht die Gelatine oder das Serum die einherschwebenden Mastixteilchen mit einer dünnen Haut, worauf die Teilchen sich verhalten, als bestünden sie aus Gelatine oder Serum.

In neuerer Zeit hat man oft die Eigenschaften des Eiweißes und seiner Derivate, der Peptone und Albumosen, mit den Eigen-

Digitized by Google

schaften anorganischer Kolloide, die nach allem zu schließen aus suspendierten ultramikroskopischen Teilchen bestehn, in Parallele zu bringen versucht. Diese werden im allgemeinen ausgefällt, wenn ganz geringe Salzmengen in dem suspendierenden Wasser aufgelöst werden, und nehmen beim Kontakt mit Wasser eine elektrische Ladung an, so daß sie, wenn man die Pole einer Batterie in das Wasser taucht, zu dem einen oder anderen hinwandern. Die Lösungen von Eiweiß und seinen Derivaten schienen sich ebenso zu verhalten. Aber nach Bechhold verhalten sich Albumose usw. nicht anders als gewöhnliche Lösungen. Dasselbe gilt offenbar auch für einige Albuminsubstanzen nach den neuen Untersuchungen von Pauli.[1]) Er unterwarf Ochsen- und Pferde-Serum einer sehr anhaltenden, sechs bis acht Wochen dauernden Dialyse. Solches Serum wanderte dann weder mit noch gegen den Strom, und wurde weder durch schwache Lösungen von Alkalisalzen, noch durch Zink-, Kupfer-, Eisen-, Quecksilber- und Bleisalze gefällt. Es wurde durch starke Erwärmung koaguliert, desgleichen durch Alkohol, und starke Lösungen von Alkalisalzen und Zinksulfat. Diese Seren enthalten zwei verschiedene Arten von Eiweißsubstanz, Albumin und Globulin, die sich nicht mit Hilfe des Stromes trennen ließen, keine von beiden Substanzen wanderte also mit dem Strome. Der große Unterschied zwischen den sogenannten organischen Kolloiden und den wahren, anorganischen Kolloiden veranlaßte Pauli, die Ansicht auszusprechen, daß man nicht versuchen sollte, die Eigenschaften der organischen Kolloide aus denen anorganischer Kolloide abzuleiten, sondern die Untersuchungen auf die Eiweißkörper beschränken soll, wenn man die Prozesse, die in der lebenden Materie vor sich gehn, aufzuklären wünscht.[2])

Eine der Eigenschaften der Eiweißkörper, die man als einen Beweis ihrer kolloidalen Natur ansah, war eben die Wanderung mit oder gegen den Strom. Dialysiertes Serum, sagt Pauli, wandert nicht, aber wenn wir eine Säure zusetzen, so folgt das Eiweiß dem positiven Strome, wenn wir der Lösung eine Basis zusetzen, so wandert es in entgegengesetzter Richtung. Diese Tatsache wird von den Anhängern der kolloidalen Theorie durch die Annahme erklärt, daß Eiweiß positive H-Ionen oder negative OH-Ionen absorbiert. Wie Bredig, Freundlich und Loeb[3]) bemerkt haben, ist dies eine Folge der wohlbekannten Tatsache, daß Eiweißkörper amphotere Elektrolyte

[1]) Pauli, Hofmeisters Beiträge 7, 531 (1906).

[2]) Pauli, Naturw. Rundschau 1906, S. 3.

[3]) vgl. Loeb, Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen S. 65—67 (Leipzig 1906).

Digitized by Google

sind, die sowohl mit Säuren wie mit Basen Salze geben, worin sie den Amidosäuren, z. B. dem Glykikoll, gleichen, mit denen die Albumine nach neueren Untersuchungen von unter anderen Kossel und E. Fischer auch nah verwandt sind. Es ist ganz richtig, daß, genau wie Ammoniak durch Anlagerung eines Wasserstoff-Ions das Ammonium-Ion bildet, auch die Amidogruppe des Eiweißkörpers Wasserstoff anlagert und ein Albumin-Ion bildet. Aber es ist ein großer Unterschied zwischen einem Ion und den suspendierten Teilchen von z. B. Kaolin, die ihre positive Ladung der Wirkung dielektrischer Kräfte verdanken. Daß die Eiweißstoffe wirklich das Wasserstoff-Ion unter Bildung eines Albumin-Ions anlagern, d. h. daß der Zusatz einer Säure ein wirkliches Neutralisations-Phänomen, wie bei Ammoniak, hervorruft, geht aus Paulis Untersuchungen klar hervor. Bei Säurezusatz nimmt die Wanderung des Eiweißes zur Kathode zuerst mit der Menge zugesetzter Säure zu und erreicht darauf einen Maximalwert. Die starke Salzsäure hat eine größere Wirkung als die schwächere Essigsäure. Offenbar hat der Eiweißstoff den Charakter einer schwachen Base und daher ist die Salzbildung größer, wenn wir Salzsäure, als wenn wir Essigsäure zusetzen, und ein Grenzwert der Wanderung wird erreicht, wenn die Substanz praktisch neutralisiert ist.

Analog verhalten sich die von Pauli untersuchten Seren gegen Alkalien. Die Wanderung zur Anode nimmt mit der Menge zugesetzten Alkalis zu, bis ein Grenzwert erreicht ist. Jetzt werden offenbar die Hydroxyl-Ionen an das Wasserstoff-Ion angelagert, das aus der sauren Carboxylgruppe der Eiweißsubstanz stammt und der Rest bleibt als Albuminat-Ion negativ geladen zurück.

Pauli fand auch, daß neutrale Salze dem Serum keine Ladung erteilen, wohl aber KH_2PO_4, das sauer reagiert, und Na_2HPO_4, Na_3PO_4, $NaHCO_3$ und Na_2CO_3, die alkalisch reagieren und die genau wie schwache Säuren oder Basen wirken. Das ist ganz selbstverständlich, sobald wir die Eiweißkörper als amphotere Elektrolyte ansehn, wenn wir sie dagegen für Kolloide halten, so können wir über den Einfluß dieser Substanzen gar nichts voraussagen. Es ist ganz unbegreiflich, wie dieser letzteren Auffassung so oft der Vorzug gegeben werden kann.

Das Verhalten von Albumose, Pepton und Hühnereiweiß ist sehr gründlich von Sjöqvist[1]) untersucht worden, der seine Leitfähigkeitsmethode auf diese Substanzen anwandte. Sjöqvist stellte fest, daß sich diese Stoffe ganz regelmäßig wie schwache Basen verhalten. Die (mittleren) Äquivalentgewichte der drei Substanzen ergaben sich

[1]) Sjöqvist, Skand. Archiv f. physiolog. Chemie 5, 59 (1895).

Digitized by Google

zu etwa 600, 250 und 800. Das Eialbumin war als Base etwa sechsmal schwächer als Asparaginsäure, aber etwa neunmal stärker als Harnstoff. Die Albumose (von Schuchard) war eine etwa 1,6 mal stärkere Base als das Eiweiß. Sjöqvist untersuchte die Neutralisation dieser Basen mittels verschiedener Säuren, wie Salz-, Schwefel-, Phosphor- und Milchsäure, und fand überall gute Übereinstimmung mit der Theorie. Die amphoteren Eigenschaften dieser Stoffe liegen auch der Untersuchungsmethode zugrunde, die Sjöqvist, Bayliss und andere auf die Wirkung des Pepsins und Trypsins angewandt haben (vgl. S. 71 und 52).

Eine Eigenschaft der Antikörper, nämlich ihre Spezifität, erinnert an das Verhalten anorganischer Kolloide, nur (oder hauptsächlich) entgegengesetzt geladene Kolloide auszufällen. Aber während das positive Kolloid Ferrihydrat von all den vielen negativen Kolloiden angegriffen wird, agglutiniert der Typhus-Bazillus nur durch Typhus-Agglutinin. Victor Henri hat in Gemeinschaft mit einigen seiner Schüler, Malloizel und Frau Girard-Mangin,[1]) einige Versuche von diesem Gesichtspunkt aus durchgeführt. Er fand, daß rote Blutkörperchen und Typhus-Bakterien, wie die meisten in Wasser suspendierten Stoffe, negativ geladen sind, und schloß daraus, daß diese Zellen von Ferrihydrat agglutiniert werden müßten, wie Biltz vorausgesagt hatte. Er fand das auch bestätigt und fand, daß normales Serum und sogar gelöste Stärke einen gewissen Schutz gegen die Agglutination bietet. Aber später untersuchten Henri und Frau Girard-Mangin auch die Wirkung negativer Kolloide und fanden genau denselben agglutinierenden Einfluß wie bei den positiven. Die „Kolloid-Theorie" erweist sich also von geringem Nutzen.

Die Eigenschaft der Proteide, positive Ionen, nicht nur Wasserstoff, sondern auch Kalium, Natrium und Calcium anzulagern, hat nach den Untersuchungen von Pauli und Loeb[2]) die größte Bedeutung für die physiologischen Funktionen dieser Proteide.

Wir haben in dem Kapitel über die Reaktionsgeschwindigkeit gesehn, daß sie bei Agglutininen der Konzentration des Agglutinins proportional ist und mit der Temperatur zunimmt. Daraus schlossen wir, daß die Agglutination auf einer chemischen Reaktion des Agglutinins mit dem Inhalt der Mikroben beruht. In seinem vorzüglichen

---

[1]) V. Henri und L. Malloizel, C. rendus de la Soc. de Biol. 56, I, 1073 (1904). Frau Girard-Mangin und V. Henri, C. r. de la Soc. de Biol. 56, II, 866, 931, 933, 935, 936 u. 974 (1904).

[2]) J. Loeb, Studies in general physiology, Teil 2, S. 544 (Chicago 1905).

Digitized by Google

Werk über Mikrobiologie zeigt Duclaux,[1]) daß diese chemische Wirkung eine Koagulation ist. Er zitiert Versuche von Kraus, bei denen die Flüssigkeit aus Kulturen von Cholera-Vibrionen, Typhus- und Pestbazillen, durch ein Chamberland-Filter filtriert, mit den spezifischen Agglutininen Koagulationen gab. Ferner zitiert er die Versuche von Nicolle, der auf das Filtrat von mazerierten Coli-Bazillen ein Agglutinin wirken ließ, das er durch Einspritzungen von Emulsionen dieser Bazillen in die Venen eines Kaninchens erhalten hatte. In einer Mischung von zehn Tropfen des Filtrates mit einem Tropfen des Kaninchen-Serums erschienen bei 37° nach einigen Stunden eine große Menge Flocken, die die größte Ähnlichkeit mit den Ausscheidungen hatten, die man aus einer Kultur lebender Coli-Bazillen bei Behandlung mit demselben Agglutinin erhält. Man könnte die Bazillen durch irgend ein feines Pulver ersetzen, z. B. Talk, dieses feine Pulver würde sich infolge der Koagulation in seiner Umgebung genau so zusammenballen, wie die Bazillen es tun. Daher ist die Bazillen enthaltende Fällung voluminöser, als die Fällung in der Flüssigkeit, aus der die Bazillen durch Filtration entfernt sind. Die Flüssigkeit, die von dem Agglutinin koaguliert wird, ist nach Nicolle sehr widerstandsfähig gegen hohe und niedrige Temperaturen. Sie ist in Alkohol und etwas in Äther löslich, so daß ein Extrakt der Bazillen in einer dieser Flüssigkeiten, zur Trockne eingedampft und in einer schwach alkalischen Bouillon gelöst, mit dem zugehörigen Agglutinin einen flockigen Niederschlag gibt.

Diese koagulierbare Substanz wird von den Bazillen erzeugt, die sie in ihrem Innern enthalten, und, wie das Experiment von Kraus zeigt, teilweise auch an die umgebende Flüssigkeit abgeben. Die Agglutinine sind in normalen Seren enthalten, z. B. im Pferde-Serum, das Cholera-Bazillen stark und gleichfalls, wenn auch schwächer, Kulturen von Vibrio Metschnikovi, Streptokokken, Typhus-, Coli-, und Tetanus-Bazillen agglutiniert. Die Seren verschiedener Tiere flocken die Erythrocyten anderer Tiere aus, so z. B. agglutiniert Pferde-Serum die Erythrocyten von Kaninchen und Meerschweinchen. Hier ist es ebenso, wie bei der Wirkung der Agglutinine auf Mikroben, möglich, den Gehalt des normalen Serums an spezifischem Agglutinin zu erhöhen, indem man die betreffenden Erythrocyten wiederholt injiziert.

Auch einfache chemische Reagenzien verursachen Agglutination der Bazillen, so werden Typhus-Bazillen z. B. von Formol, Wasserstoffsuperoxyd und starkem Alkohol agglutiniert. Hier zeigt sich oft

---

[1]) Duclaux, Traité de microbiologie, Bd. 2, S. 706 (Paris 1899).

Digitized by Google

die Erscheinung, daß eine größere Dose des Reagens keine Agglutination hervorruft, während eine kleinere Dose wirkt. Bossaert untersuchte die Wirkung von Essigsäure auf gewisse Cholera-Vibrionen und fand, daß sie in der Konzentration von 0,1 % nicht agglutiniert, in 10 prozentiger Lösung eine stark agglutinierende Wirkung hat, und sie bei 50 % Stärke wieder verliert. Quecksilberchlorid agglutiniert schon in einer Konzentration von 0,3 % und Safranin und Vesuvin schon in Konzentrationen von 0,05 %. Auch hier sind verschiedene Bazillen verschieden empfindlich, so sind Typhus-Bazillen mehr als zehnmal so empfindlich gegen Safranin als Coli-Bazillen.

Wenn die Wirkung der Agglutinine in einer Koagulation des Bazillen-Inhaltes besteht, so sind die Resultate der Bechholdschen Versuche leicht zu verstehn, nach denen andere koagulierende Substanzen, wie Alkohol, Säuren und Uranylacetat die Eigenschaften der Bazillen fast ebenso verändern, wie die spezifischen Agglutinine. Die Agglutinine sind daher wahrscheinlich nur eine besondere Art Präzipitine, denen sie auch darin vielfach ähneln, daß sie in bestimmten Konzentrationen Maxima der Wirkung aufweisen.

Kapitel 6: Neutralisation der hämolytischen Eigenschaften von Basen und von Lysinen bakteriellen Ursprungs.

Die einfachsten hämolytischen Agenzien sind die Basen und Säuren. Die Wirkung insbesondere der Basen auf Erythrocyten hat viel Ähnlichkeit mit der Wirkung der Hämolysine bakteriellen Ursprungs. Nun ist klar, daß der Zusatz einer Säure zu einer alkalischen Lösung, der die Alkalität neutralisiert, auch die hämolytische Wirkung neutralisieren wird. (In einigen wenigen Fällen, wie z. B. Ölsäure, gilt das nicht, weil alle Olein-Derivate hämolytische Agenzien sind, aber im allgemeinen sind Salze das nicht.)

Diese Neutralisation bietet die klarste Analogie mit der Neutralisation eines Lysins, z. B. des Tetanolysins mit seinem Antilysin. Auf den ersten Blick scheint eine Differenz darin zu liegen, daß jede Basis von jeder Säure neutralisiert wird, während Antitetanolysin durchaus ein Spezifikum gegen Tetanolysin ist, und auf kein anderes Lysin eine neutralisierende Wirkung hat. Aber dieser Unterschied ist mehr scheinbar als wirklich, denn wir wissen jetzt, daß alle Säuren

Digitized by Google

Wasserstoff-Ionen enthalten, die die allen Basen gemeinsamen Hydroxyl-Ionen binden.

Es erschien daher Madsen und mir als das Aussichtsvollste, was zur Aufklärung der Neutralisation von Lysinen durch Antilysine versucht werden konnte, die Neutralisation einer Base, betrachtet als hämolytisches Agens, und eines Lysins durch sein Antilysin vergleichend zu untersuchen. Zu diesem Zwecke stellten wir eine gründliche Untersuchung an, die die Wirkung von Basen, Säuren und Salzen auf Erythrocyten, sowie die hämolytische Wirkung eines Lysins, des Tetanolysins, in Gegenwart seines Antilysins und verschiedener anderer, sogenannter neutraler Substanzen, wie Salze und verschiedene Proteide, umfaßte. — Das Tetanolysin wurde deshalb gewählt, weil es sich bei der Neutralisation sehr ähnlich wie das praktisch wichtigste aller Toxine, das Diphtheriegift, verhält. — Diese Untersuchung zeigte uns, daß zwischen den beiden Neutralisationsphänomenen eine vollständige Analogie herrscht.[1])

Wenn wir irgend eine Base, z. B. Ammoniak oder Natronhydrat, zu roten Blutkörperchen bringen, so finden wir, daß die ersten Spuren Alkali keinerlei hämolytische Wirkung haben. Diese erste, unwirksame Menge scheint ziemlich fest von den Blutkörperchen gebunden zu werden, denn sie ist innerhalb der Versuchsfehler der angewandten Blutmenge proportional, und die von derselben Menge Blutkörperchen gebundenen Mengen Natronhydrat und Ammoniak sind einander chemisch äquivalent (vgl. S. 73). Bei Zusatz größerer Alkalimengen tritt zunächst eine sehr schwache Hämolyse auf, die Flüssigkeit wird nur schwach gelb. Wenn die Alkalimenge wächst, so wächst die hämolysierte Menge roter Blutkörperchen sehr schnell, oft nahezu proportional dem Quadrat der nicht gebundenen Alkalimenge. So geht es fort bis zur totalen Hämolyse, d. h. bis alle roten Blutkörperchen ihr Hämoglobin an die umgebende Flüssigkeit abgegeben haben. Ein noch größerer Alkalizusatz bringt keine Änderung in der Quantität der Hämolyse mehr hervor, nur die Reaktionsgeschwindigkeit wächst. Dasselbe gilt auch für die Wirkung von Hämolysinen wie Tetanolysin, nur ist es oft unmöglich, eine bestimmte Menge davon zu finden, die gebunden wird, ehe irgendwelche Wirkung eintritt. Es scheint auch dann eine chemische Bindung stattzufinden, aber die Verbindung scheint in hohem Grade dissoziiert zu sein, so daß keine scharfe Grenze festzustellen ist.

---

[1]) Arrhenius und Madsen, Festskrift, Kopenhagen 1902, Nr. 3. Zeitschr. f. physikal. Chemie 44, 7 (1903).

Digitized by Google

Um einen Begriff von diesen Vorgängen zu geben, will ich einige Zahlen aufführen, die die hämolytische Wirkung von einigen Lysinen betreffen (vgl. S. 67). Für das Saponin wurden 2 prozentige Emulsionen von Ochsenblutkörperchen, für die andren Hämolysine 2,5 prozentige Emulsionen von Pferdeblutkörperchen angewandt. Wenn das Gift zu der Blutemulsion gegeben war, wurde diese umgeschüttelt und auf eine Stunde in einen Brutschrank von 37° gestellt, darauf stand sie 18 Stunden im Eisschrank und wurde dann mit Hämoglobinlösungen verschiedener Konzentration verglichen, die hergestellt waren, indem verschiedene Mengen gleichartiger Blutkörperchen mit reinem Wasser hämolysiert wurden. Die Konzentration ist bei Kaliumhydrat in Bruchteilen der Normalität, bei den andren Substanzen in Bruchteilen der gesamten Flüssigkeit (Gewicht des gelösten Stoffes : Gewicht der Lösung) gegeben.

Saponin			Natrium-Taurochlorat		
Konz. c. 10^6	H	$\varkappa \cdot 10^{-5}$	Konz. c. 10^5	H	$\varkappa \cdot 10^{-3}$
40	90	2,35	140	91	6,81
28	40	2,26	100	55	7,41
20	10	1,58	68	18	7,41
14	5	1,60	48	4	4,17
10	3	1,73	32	2,5	4,94
7	2	2,02	20	1,3	5,70

Kaliumhydrat			Solanin		
Konz. c. 10^5	H	$\varkappa \cdot 10^{-3}$	Konz. c. 10^6	H	$\varkappa \cdot 10^{-3}$
62,5	27	8,31	40	86	2,32
50	13	7,21	28	70	2,98
57,5	4	5,33	20	4	1,00
31,3	3,5	5,98	14	2,4	1,11
25	2	5,66	10	1,5	1,5

Man sieht aus diesen Zahlen, daß das Gesetz, nach dem der Hämolysegrad der Quadratwurzel der Konzentration proportional ist, bei diesen Giften längst nicht so annähernd erfüllt ist, wie bei Tetanolysin und Ammoniak. Der Quotient dieser zwei Größen ist in der Tabelle unter $\varkappa$ verzeichnet. Im allgemeinen ist die Abweichung von dieser Regel um so größer, je größer die Reaktionsgeschwindigkeit ist. Bei etwa 10% wächst die Hämolyse verhältnismäßig rascher mit der Konzentration, als bei anderen Hämolysegraden. Daher ist die Bestimmung der anwesenden Giftmenge mit Hilfe der Hämolyse am genausten in der Nähe dieses Punktes.

Verschieden starke einwertige Basen wirken in äquivalenten Mengen nahezu in gleichem Maße auf die Blutkörperchen. Die zweiwertigen

Digitized by Google

Basen $Ca(OH)_2$ und $Ba(OH)_2$ scheinen einen festen Niederschlag in den Erythrocyten zu bilden, der die Messung hindert, wenigstens bei höherer Konzentration. Die beobachtete Hämolyse ist dann nahezu unabhängig von der Menge zugesetzter Base. Ammoniak hat eine nahezu ebenso starke Wirkung wie äquivalente Mengen der starken einwertigen Basen. Bisweilen (bei kleinen Blutkonzentrationen) ist seine Wirkung etwas geringer, in andren Fällen (bei größeren Blutkonzentrationen) ist sie etwas größer als die der starken Basen (nach langer Reaktionszeit, vgl. S. 73). Daraus scheint hervorzugehen, daß sich eine Verbindung bildet, so daß äquivalente Mengen in gleichem Maße wirken, die Ammoniakverbindung aber ein wenig hydrolysiert ist, was die Abweichungen verursacht.

Auch die Säuren zerstören die roten Blutkörperchen, aber diese Erscheinung hat ein etwas verschiedenes Aussehen von der Hämolyse durch Basen. Nach der Einwirkung von Basen oder auch von Lysinen bakteriellen Ursprungs hat die Flüssigkeit, die die Blutkörperchen umgibt, deren intensiv purpurnen Farbstoff aufgenommen und erscheint in der charakteristischen roten Blutfarbe. Die Säuren dagegen verändern den Farbstoff, so daß die Flüssigkeit dunkelbraun wird und beim Schütteln schäumt; der Schaum steht oft 48 Stunden und mehr. Bei schwächeren Graden der Hämolyse durch Säuren hat die Flüssigkeit auch einen rötlichen Stich. Zugleich ist eine starke Agglutination der roten Blutkörperchen bemerkbar. Bei höheren Konzentrationen bilden sich große Klumpen, ein wenig an die flockigen Niederschläge erinnernd, die Aluminiumsalze mit Alkalien geben. Der Grad der Hämolyse durch eine starke Säure ist etwa ebensogroß, wie durch die drei- bis viermal äquivalente Menge einer starken Base. Äquivalente Mengen verschiedener Säuren (Salz-, Schwefel-, Oxal-, Wein-, Zitronen- und Essigsäure) hämolysieren annähernd bis zu demselben Grade, die schwachen, z. B. Essigsäure, wirken etwas langsamer als die starken, und äußerst schwache Säuren, wie Borsäure, üben keine meßbare hämolytische Wirkung aus (dasselbe gilt wahrscheinlich für äußerst schwache Basen).

Bei stärkeren Konzentrationen der Hämolysine tritt totale Hämolyse auf, wenn man sie eine genügende Zeit einwirken läßt. Wenn die Einwirkung durch Zentrifugieren unterbrochen wird, so kann man die Entwicklung der Reaktion verfolgen, wie oben besprochen (s. S. 65—66).

Die Gegenwart von Salzen[1]) übt einen stark abschwächenden

[1]) Bei der Untersuchung dieses Effektes bereitet man eine physiologische Lösung aus Rohrzucker.

Digitized by Google

Einfluß auf die hämolytische Kraft der Alkalien aus. Besonders groß ist der Einfluß von Ammoniaksalzen auf Ammoniak. Die verschiedenen Salze der starken Basen (KOH, NaOH und LiOH) sind in äquivalenten Konzentrationen gleich wirksam. Die Wirkung ist der Kubikwurzel aus der Konzentration nahezu proportional, 0,02 n Salzlösung erniedrigt die Hämolyse im Verhältnis 1:0,4. Die Ammoniaksalze scheinen untereinander in dieser Hinsicht auch sehr ähnlich zu sein. 0,004-n NH_3-Salz vermindert die Hämolyse im Verhältnis 1:0,4, 0,016-n im Verhältnis 1:0,25 und 0,06-n im Verhältnis 1:0,14.

Andrerseits ist es vollkommen klar, daß der Zusatz einer äquivalenten Menge Salzsäure zu einer Natronhydratlösung deren hämo-

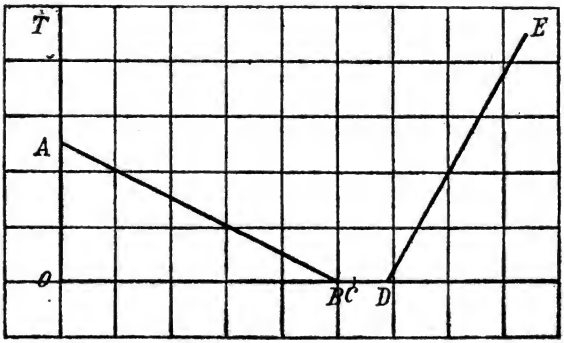


Fig. 2.

lytische Kraft vollkommen aufheben muß. Bei diesem Vorgang bildet sich nämlich Chlornatrium, das keinen hämolytischen Effekt hat. Eine zu 50% neutralisierte Natronhydratlösung müßte in doppelter Menge als eine reine verwandt werden, um dieselbe Wirkung zu erreichen; eine kleine Korrektion wäre für den Einfluß des Salzes, sowie für die gebundene, unwirksame Alkalimenge anzubringen. Wir sagen dann, daß die Toxicität der ersten Lösung halb so groß, wie die der zweiten ist, und allgemein bedeutet der Ausdruck: „eine Lösung hat n-mal weniger Toxicität als eine andre", daß von der ersten Lösung eine n-mal größere Menge dieselbe Giftwirkung hervorbringt, wie von der zweiten. Die Wirkung der Neutralisation von Natronhydrat durch Salzsäure kann graphisch durch die Linie AB der vorstehenden Fig. 2 dargestellt werden. Diese Linie wäre eine Gerade, wenn das Salz nicht seinen störenden Einfluß ausübte.

Digitized by Google

Wenn wir soviel Säure zugesetzt haben, daß wir das freie Alkali neutralisiert haben (Punkt B), müssen wir noch eine kleine Menge zusetzen, um das in den Erythrocyten gebundene Alkali zu neutralisieren und dann noch eine kleine Menge, ehe die Lösung stark genug ist, wieder Hämolyse zu geben. Diese Anteile sind im Diagramm durch die Stücke BC und CD dargestellt. Bei weiterem Säurezusatz wächst die Toxicität der Lösung nahezu proportional der Menge freier Säure, die weder an das Alkali gebunden ist noch in den Erythrocyten gebunden wird. Diese Toxicität ist dargestellt durch die nahezu gerade Linie DE.

Ungefähr ebenso ändert sich die Toxicität, wenn eine starke Säure zu einer Ammoniaklösung gegeben wird. Die Linie AB weicht

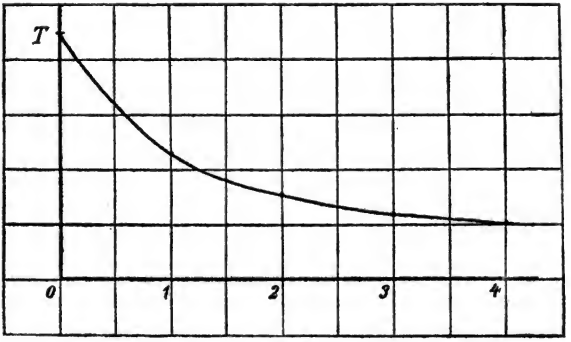


Fig. 3.

dann etwas mehr, jedoch nicht viel, von einer geraden Linie ab, entsprechend dem verhältnismäßig großen Einfluß der Ammoniumsalze. Die wirkliche Kurve läge etwas unter AB.

Aber wenn wir zu der Ammoniaklösung eine sehr schwache Säure, wie Borsäure, die keine merkliche hämolytische Wirkung hat, zusetzen, so bekommt die Erscheinung ein ganz andres Aussehen, und zwar infolge der hydrolytischen Wirkung des Lösungsmittels, des Wassers. Die Hydrolyse hat zur Folge, daß immer eine gewisse Menge Ammoniak frei bleibt, selbst wenn wir die größte Menge Borsäure zusetzen, die überhaupt, der Löslichkeit wegen, möglich ist. Dann fällt die Kurve der Toxicität zwar, wenn die Menge der Borsäure wächst, aber erreicht niemals Null, sondern nimmt die Form an, die Fig. 3 zeigt. Die Menge q des freien Ammoniaks kann nach der Gleichung berechnet werden:

Digitized by Google

$$q\ (n - a + q) = \varkappa\ (a - q)^2$$

worin a die Menge Ammoniak bedeutet, die von Anfang an, vor Zusatz der Borsäure, anwesend war, n die zugesetzte Borsäuremenge, folglich $(a - q)$ die Menge gebildeten Salzes und $[n - (a - q)]$ die Menge freier Borsäure. Die Mengen müssen in Äquivalenten ausgedrückt werden. Ein Molekül NH_3 zeigte sich äquivalent einem Molekül BO_3H_3. Die Konstante $\varkappa$ hat einen von der Temperatur abhängigen Wert. Die Gleichung selbst ist eine Form der Gleichung, die das Gesetz von Guldberg und Waage ausdrückt. Eine besondere theoretische Untersuchung zeigte, das es hier anwendbar ist.

Nun ist hier die Toxicität proportional der Konzentration des freien Ammoniaks, wobei eine Korrektion für die schwächende Wirkung des Ammoniumsalzes angebracht werden muß, entsprechend den Versuchen über diese Wirkung. Wenn wir Versuche über die Toxicität von Ammoniak bei Zusatz verschiedener Mengen Borsäure ausführen, können wir daher die Toxicität nach der zitierten Formel berechnen. Andrerseits können wir die Toxicität direkt mittels der Hämolyse messen. Dabei wird angenommen, daß der von den Erythrocyten absorbierte Anteil des Ammoniaks vernachlässigt werden kann. Der Vergleich zwischen Beobachtung und Rechnung ($\varkappa = 1{,}02$) ist in der folgenden Tabelle gegeben.

Toxicität T von 0,1 n NH_3 (1 Äquivalent) + n Äquivalenten Borsäure.

n	$T_{beob.}$	$T_{ber.}$	$\Delta\ T_{beob.}$
0,00	100	(100)	—
0,17	85	79	15
0,33	69	64	16
0,67	43	42	26 : 2 = 13
1,00	25	27	18 : 2 = 9
1,33	20	18	5 : 2 }
1,67	13	13	7 : 2 } 2,5
2,00	10	10	3 : 2 }

Die Übereinstimmung zwischen beobachteten und berechneten Werten von T ist ganz in den Grenzen der Beobachtungsfehler. Unter $\Delta\ T_{beob.}$ ist die Ammoniakmenge aufgeführt, die in bezug auf ihre Toxicität neutralisiert wird, wenn je ein sechstel Äquivalent Borsäure zugesetzt wird. Die beiden ersten Zusätze schwächen die Toxicität um nahezu denselben Betrag (16,7 %) wie eine starke Säure. Die Fraktionen zwischen ein und zwei Drittel und zwischen zwei und drei Dritteln haben einen bedeutend geringeren Einfluß (etwa $^4/_6$ und $^3/_6$). Das nächste Äquivalent Borsäure hat nur eine Wirkung gleich dem fünften Teil des ersten Äquivalentes.

Digitized by Google

Dieses Verhalten ist in hohem Maße ähnlich dem sogenannten Ehrlichschen Phänomen, das bei der Neutralisation von Toxin und Antitoxin beobachtet wird. Der erste Toxinzusatz neutralisiert im allgemeinen einen größern Teil des Toxins als der zweite Zusatz, dieser einen größern als der dritte usf. Um diese Eigentümlichkeit beim Diphtherietoxin zu erklären, nimmt Ehrlich an, daß das Toxin eine Mischung vieler verschiedener „Partialtoxine" ist, die in gleicher Menge verschiedene Grade der Toxicität aufweisen und eine verschiedene Affinität zum Antitoxin haben. Wenn Antitoxin zugesetzt wird, so neutralisiert es zuerst den Teil des Giftes, der die größte Affinität hat, und zugleich das stärkste Gift ist, darauf den mit der

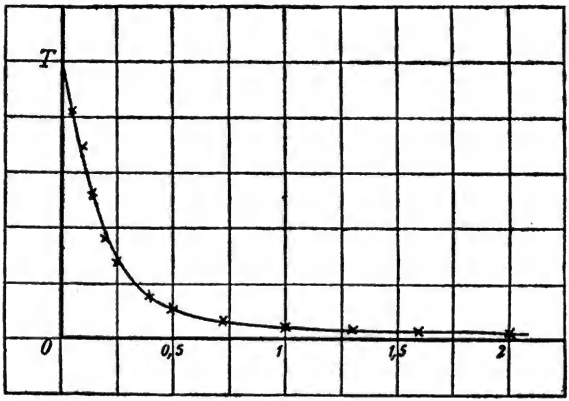


Fig. 4.

nächst großen Affinität, der zugleich die nächst große Giftigkeit hat, usw. Schließlich werden die allerschwächsten Gifte neutralisiert. Ehrlich nannte diese hypothetischen „Partialgifte" mit aus dem Griechischen entnommenen Namen Prototoxin, Deuterotoxin, Tritotoxin, Epitoxin usw.

Wenn wir Ehrlichs Ansichten auf Ammoniak anwenden, so müßte dieser Körper, nach dem Verlauf der Neutralisation mit Borsäure zu schließen, aus verschiedenen „Partial-Ammoniaken" zusammengesetzt sein, von denen das stärkste zuerst neutralisiert würde, das zweitstärkste zu zweit usw. Natürlich ist diese komplizierte Erklärung unmöglich auf Ammoniak anzuwenden, von dem wir wissen, daß es eine ganz einfache chemische Verbindung von hoher Reinheit ist, aber Ehrlich und seine Schüler wandten sie ganz allgemein auf

Digitized by Google

andre Gifte an, z. B. auf Diphtheriegift und Tetanolysin, die sich bei der Neutralisation durchaus ähnlich wie Ammoniak verhalten.

Die folgenden Zahlen, die für die Toxicität von Tetanolysin nach Zusatz verschiedener Mengen Antitoxin gefunden wurden, mögen als Beispiel dienen. Sie sind veranschaulicht durch Fig. 4. Die Kurve hat am Anfang eine Tangente, die die x-Achse im Punkt $x = 0{,}276$ schneidet, was bedeutet, daß 0,276 Teile (ccm) der angewandten Antitoxin-Einheitsmenge die ganze Toxinmenge (2 ccm einer 2 prozentigen Lösung) vollständig neutralisieren würden, wenn die Neutralisation nach denselben Gesetzen verliefe, wie die Neutralisation starker Säuren mit starken Basen, d. h., wenn die neutralisierte Menge der zugesetzten Antitoxinmenge proportional wäre, bis vollständige Neutralisation erreicht ist. Mit andren Worten, 0,276 ccm Antitoxin und 2 ccm Toxin sind äquivalent. Mit Hilfe dieses Wertes sind in der folgenden Tabelle die Mengen n des Antitoxins in Äquivalente n_1 umgerechnet, das Äquivalent der anwesenden Toxinmenge als Einheit angenommen.

Toxität T von Tetanolysin nach Zusatz von n ccm Antilysin.

n	n_1	$T_{beob.}$	$T_{ber.}$
0	0	100	100
0,05	0,18	82	82
0,1	0,36	70	66
0,15	0,54	52	52
0,2	0,72	36	38
0,3	1,09	22	23
0,4	1,45	14,2	13,9
0,5	1,81	10,1	10,4
0,7	2,54	6,1	6,3
1,0	3,26	4,0	4,0
1,3	4,35	2,7	2,9
1,6	5,44	2,0	2,5
2,0	6,52	1,8	1,9

Die berechneten Zahlen sind mit Hilfe derselben Gleichung abgeleitet, die oben für das Ammoniak gegeben wurde, mit der Konstanten 0,115. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß die Mischungen von Toxin und Antitoxin zwei Stunden lang bei 20° C gehalten, darauf mit der Blutemulsion (2,5% Pferdeblut) gemischt und eine Stunde lang im Thermostaten von 37° gehalten wurden. Der Grad der Hämolyse wurde bestimmt wie oben beschrieben (vgl. S. 11). Die Konstante 0,115 gilt daher für 20° C.

Das Antitoxin, das verwandt wurde, war eine Lösung, die im ccm 0,0025% des Antitoxingehalts einer Standard-Lösung enthielt.

Digitized by Google

Das will sagen, das ursprüngliche antitoxinhaltige Blutserum eines mit Tetanusgift geimpften Pferdes enthielt in 1 ccm nahezu 5800 mal so viel Antitoxin, wie der Giftmenge äquivalent war, die in 1 g des trocknen Tetanuspräparates, bereitet durch Fällung einer starken Tetanusbouillon mittels Ammoniumsulfat, enthalten war. Aus dieser Zahl sieht man ohne weiteres, daß das geimpfte Pferd in seinem Blut (etwa 50 Liter) viele (etwa 15) Millionen mal die äquivalente Menge des injizierten Giftes (etwa 20 g, manchmal kann die Menge noch geringer sein) enthält. Diese Tatsache steht dem auf den ersten Blick recht einleuchtenden Gedanken — er wurde von Behring ausgesprochen — entgegen, daß das Antitoxin ein Abkömmling des injizierten Toxins ist. Zu ähnlichen Resultaten haben die Versuche über Erzeugung von Diphtherie-Antitoxin geführt.

Die Kurve, die Madsens Versuche über Tetanolysin widergibt, ist zur x-Achse konvex, der sie sich nähert, ohne sie zu erreichen. Das besagt: je größer die Menge des zugesetzten Antitoxins ist, desto kleiner ist die neutralisierende Kraft einer bestimmten Menge Antitoxin. Aber es liegt kein Grund vor, diese Eigentümlichkeit durch die Hypothese zu erklären, daß in der Toxinlösung eine große Anzahl Gifte nebeneinander existiere.

Die Gleichung, die wir für die Berechnung der Resultate benutzt haben, und die sehr gut mit den Versuchen übereinstimmt, hat folgende Form:

$$(\text{Freie Lysinmenge}) \times (\text{freie Antitoxinmenge}) \rightleftarrows \varkappa\ (\text{gebundene Toxinmenge})^2$$

Nach den Gesetzen der physikalischen Chemie sagt diese Gleichung aus, daß aus einem Molekül Toxin und einem Molekül Antitoxin zwei Moleküle der Reaktionsprodukte entstehen.

Diese Reaktion ist daher ziemlich ähnlich der Reaktion zwischen Alkohol und Säure, bei der Ester und Wasser entstehen, und bei der je ein Molekül beider Substanzen in die chemische Reaktionsgleichung eingeht. Wenn hier äquivalente Mengen der Reagenzien angewandt werden, so verwandeln sie sich zu zwei Drittel in Ester und Wasser, bis Gleichgewicht erreicht ist; die Konstante $\varkappa$ ist 0,25, etwa doppelt so groß wie für Tetanolysin gefunden.

Die Konstante $\varkappa$ der Gleichgewichtsgleichung ändert sich mit der Temperatur. Als Madsen und ich diese Erscheinung zum ersten Male untersuchten, fanden wir eine große Zunahme, im Verhältnis 1 : 4,7, im Temperaturintervall von 20—37,3°. Später Versuche haben einen viel kleineren Wert der Zunahme ergeben, sie bewegte

Digitized by Google

lauf dieser Zeit wurde ein Teil der Mischung zu 8 ccm Pferdeblutemulsion (2 %) zugegeben und die Reaktion beobachtet. Die Gleichgewichtsgleichung sagt aus, daß ein Gramm-Molekül der Reaktionsprodukte aus einem Molekül Lysin und einem Molekül Cholesterin entsteht. 1,43 ccm der Cholesterinlösung waren äquivalent mit 5 ccm der Brühe, die also die Konzentration $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ normal hat.

Neutralisation von Tetanolysin durch n ccm 10^{-6}-n Cholesterin bei 37° C (Madsen und Walbum).

n	$T_{beob.}$	$T_{ber.}$
0	100	100
0,5	67,5	66
0,75	51	49,5
1	34,5	34
1,2	27	23
1,4	15	14
1,6	8	9
1,8	5,5	6,2
2	3,4	4,2

Wenn wir die Konzentration, bei der 5 cc der Tetanusbrühe in 10 cc enthalten sind, als Einheitskonzentration wählen, so finden wir einen Wert $\varkappa = 0{,}021$ in der Gleichung

(Konz. d. Tetanolysins) (Konz. d. Cholesterins) $= \varkappa$ (Konz. d. Verbind.)

Auch hier sind die beobachteten T-Werte bei großem n etwas kleiner als die berechneten.

Auch einige sogenannte neutrale Stoffe haben einen Einfluß auf die hämolytische Wirkung des Tetanolysins. Gegenwart von Salzen in größerer Menge verstärkt die Wirkung. Hierbei suspendiert man die Erythrocyten in einer physiologischen Rohrzuckerlösung. Wenn dann Salz bis zu 0,04 normaler Konzentration zugesetzt wird, so wächst die Hämolyse (in einer Stunde bei 37°) auf etwa den doppelten Wert. Eine 0,01 normale Lösung ist ohne erkennbare Wirkung. Verschiedene Salze scheinen in gleicher Konzentration den gleichen Einfluß auszuüben. Dieser Einfluß beruht wahrscheinlich auf einer Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit. Aus diesem Grunde scheinen Lysine in physiologischer Salzlösung giftiger zu sein, als in ebensolcher Rohrzuckerlösung.

Die Anwesenheit von Proteinen, wie Eialbumin und normales Serum, schützt die Erythrocyten gegen den Angriff von Basen und noch mehr gegen Lysine bakteriellen Ursprungs. Wahrscheinlich besteht diese Wirkung hauptsächlich in einer Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit. Große Mengen normales Serum wirken wie ein Antitoxin.

Digitized by Google

Der antitoxische Einfluß normalen Serums wurde zuerst von Ehrlich[1]) beobachtet, der Pferdeserum gegen Tetanolysin wirken ließ. Neißer und Wechsberg[2]) fanden eine ähnliche Wirkung von Pferdeserum und menschlichem Serum auf Staphylotoxin. Madsen und ich[3]) beobachteten eine Wirkung von Hühnereiweiß auf Tetanolysin, und noch größer ist nach P. T. Müller[4]) die Wirkung des Taubeneiweißes. Marshall und Morgenroth[5]) beobachteten ähnliches bei der Wirkung verschiedener Seren auf verschiedene zusammengesetzte Hämolysine (vgl. Kap. 8).

In Mischungen, die große Mengen Gift und Antitoxin enthalten, ist die Reaktionsgeschwindigkeit stark herabgesetzt, wahrscheinlich wegen der Anwesenheit ziemlich großer Proteinmengen, die den Gift- und Antitoxinpräparaten als Verunreinigungen anhaften.

Die Wirkung der verschiedenen Antikörper auf die entsprechenden Gifte besteht, wie wir annehmen, in einer einfachen Neutralisation, Molekül für Molekül. Auf diesen Vorgang folgt aber ein zweiter, wie mehrere Tatsachen andeuten. Bei hoher Konzentration des Antitoxins, wenn es im Überschuß über das anwesende Toxin vorhanden ist, überschreiten die berechneten Werte oft um auffällige Beträge die beobachteten. Auch ein anderes Phänomen, das von Danysz[6]) entdeckt worden ist, zeigt einen störenden Einfluß eines Antitoxinüberschusses an. Danysz untersuchte die Toxicität von Mischungen von Ricin und Antiricin. Er beobachtete, daß eine Mischung von *a* Teilen Ricin und *b* Teilen Antiricin weniger toxisch ist, wenn die beiden Bestandteile mit einem Male gemischt werden, als wenn ein Teil von *a*, etwa die Hälfte, zu *b* Teilen Antitoxin gefügt wird, und nach einiger Zeit der Rest des Toxins in die Mischung gebracht wird. Dieselbe Erscheinung beobachteten von Dungern[7]) an Diphtheriegift und Sachs[8]) an Tetanolysin, Staphylolysin und Lab. Hingegen zeigt das Cobragift diesen Effekt nicht.

Um diese merkwürdige Erscheinung aufzuklären, die zu zeigen scheint, daß dieselbe Giftmenge verschiedene Mengen Antikörper zu binden vermag, hat Madsen eine große Anzahl Versuche ausgeführt,

---

[1]) Ehrlich, Berl. klin. Wochensch. 1898, Nr. 12.
[2]) Neißer und Wechsberg, Zeitsch. f. Hygiene **36**, 314 usw. (1901).
[3]) Arrhenius und Madsen, Festskr. III, 37 u. 43 (1902).
[4]) P. T. Müller, Zentralbl. f. Bakteriologie **1**, 34, 567 (1903).
[5]) Marshall und Morgenroth, Zeitschr. f. klin. Med. **47**, 3 u. 4.
[6]) Danysz, Ann. de l'inst. Pasteur, 1902.
[7]) v. Dungern, Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 8 u. 9.
[8]) Sachs, Zentralbl. f. Bakteriologie **37**, I, 251 (1904).

Digitized by Google

die das Verhalten des Tetanolysins in dieser Hinsicht zum Gegenstand haben, und ich habe sie berechnet.[1]) Vorversuche zeigten, daß der Effekt mit der Menge anwesenden Antitoxins zunahm und daß die Verdünnung der reagierenden Substanzen keinen Einfluß hatte, daß also der vorherrschende chemische Vorgang monomolekular sein mußte.

Ein ccm einer tetanolysinhaltigen Bouillon wurde zu 0,8 ccm einer Lösung gegeben, die Antilysin enthielt, und von der 0,18 ccm mit 1 ccm der lysinhaltigen Lösung äquivalent waren. Diese Mischung wurde während einer bestimmten Zeit t bei 37° gehalten, darauf mit 3 ccm des Giftes gemischt, und das ganze wieder 30 Minuten lang bei 37° gehalten. Die Toxicität G wurde in der gewöhnlichen Weise bestimmt und gefunden, daß sie mit der Zeit t wuchs, in der Art, daß sie gegen einen Maximalwert G_∞ konvergierte. Wenn G_0 (gültig für die Zeit 0) als Einheit genommen wird, so ist die Differenz $G - G_0$ ein Maß des untersuchten Effektes. Die Differenz $G_\infty - G$ gibt den Fortschritt des Effektes mit der Zeit an. Diese Menge wird in die Rechnung eingeführt unter der Annahme, daß sie einem monomolekularen Prozeß mit der Reaktionskonstante $\varkappa$ entspricht. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle gegeben.

Der Fortschritt des Danysz-Effektes bei Tetanolysin mit der Zeit.

t (Std.)	G	G—Go	G∞—G	log (G∞—G)	$\varkappa$
0	1,00	0	0,60	0,778—1	—
0,167	1,04	0,04	0,56	0,748—1	0,180
0,5	1,14	0,14	0,46	0,663—1	0,230
1	1,24	0,24	0,36	0,556—1	0,222
2	1,33	0,33	0,27	0,431—1	0,173
4	1,47	0,47	0,13	0,114—1	0,168
6	1,57	0,57	0,03	0,477—2	0,217
∞	1,60	0,60	0		0,197

In derselben Weise wurde $\varkappa$ bei 19,7° zu 0,067 und bei 27° zu 0,105 bestimmt. Das entspricht einer Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit im Verhältnis 1,86:1 und 1,87:1 bei einer Temperatursteigerung um 10°. Die Reaktion geht, wie die Konstanz von $\varkappa$ zeigt, nach dem Schema der monomolekularen Reaktionen.

Bei andren Versuchen wurde die Antilysinmenge A variiert; folgende Werte von $G_\infty - G_0$ wurden gefunden. Die Lysinmengen L waren etwa die gleichen, nämlich 1 ccm als erste und 3 ccm als zweite Fraktion und die Versuche wurden wie oben ausgeführt.

[1]) Madsen u. Arrhenius, Medd. fr. Vet.-Ak. s. Nobelinstitut, 1, Nr. 3, 1906.

Digitized by Google

Größe des Danysz-Effektes in seiner Abhängigkeit von der angewandten Antitoxinmenge.

Erste Fraktion.			$(G\infty - G0)$	
cc A	+	cc L	beob.	ber.
0,2		1	0,05	0,02 (0,02)
0,4		1	0,23	0,21 (0,22)
0,6		1	0,39	0,40 (0,41)
0,8		1	0,60	0,60 (0,63)
1,2		1	0,97	0,99 (0,87)

Die berechneten Werte sind unter der Annahme gefunden, daß der Effekt proportional ist dem Antitoxinüberschuß über 0,18 ccm, d. h. über diejenige Menge, die dem Lysin (1 ccm) der ersten Fraktion äquivalent ist. Diese Proportionalität ist in den obigen Zahlen sehr ausgesprochen. Der Effekt kann auch berechnet werden als die von dem Gift gebundene Antitoxinmenge, vermindert um die Antitoxinmenge, die das Gift binden würde, wenn es auf einmal zugesetzt würde. Die so berechneten Zahlen sind in Klammern gesetzt.

Offenbar beruht der Effekt auf einer langsamen molekularen Veränderung in dem Antitoxin, das vom Toxin nicht gebunden ist. Der Prozeß geht nur vor sich, wenn Neutralisationsprodukte von Toxin und Antitoxin — oder das freie Toxin selbst — zugegen sind, die daher das veränderte Antitoxin zu binden scheinen, so daß der Prozeß weitergehen kann. Aus der Tatsache, daß der Danysz-Effekt bei Cobragift nicht beobachtet ist, scheint hervorzugehen, daß das Gift selbst das umgewandelte Antitoxin bindet. Denn in diesem besonderen Falle ist die Neutralisation nahezu so vollständig, wie die Neutralisation einer starken Säure durch eine starke Basis, und wenn das Antitoxin im Überschuß zugegen ist, ist folglich keine merkliche Menge freien Giftes in der Lösung vorhanden, und wir dürfen erwarten, daß auch der Effekt unmerklich wird.

Durch die rückläufige Reaktion der Reaktionsprodukte können immer neue Mengen Toxin frei werden und das umgewandelte Antitoxin binden. Die neue Reaktion zwischen verändertem Antitoxin und Toxin ist viel vollständiger als die Hauptreaktion zwischen diesen Substanzen, die während der ersten Zeit vorwiegt und die dem oben besprochenen Gleichgewicht entspricht. Folglich finden wir, daß „das Band zwischen Toxin und Antitoxin“ mit der Zeit fester wird. Deshalb erweist sich auch die Toxicität von Lösungen, die einen Überschuß von Antitoxin enthalten, als zu klein gegenüber den berechneten Werten. Es wird erklärlich, daß Mischungen mit einem großen Überschuß an Antitoxin praktisch unschädlich sein können, obwohl die

Digitized by Google

Rechnung es nicht anzeigt. So erklären sich auch einige Versuche von Madsen, in denen er eine „ungiftige“ Mischung von Diphtherietoxin mit Antitoxin — also eine solche, die einen großen Überschuß an freiem Antitoxin enthielt — in eine Gelatinelösung diffundieren ließ, die er in einer Probierröhre mit der Mischung überschichtete. Wenn die Mischung eine bestimmte Zeit, etwa eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur, aufbewahrt worden war, so konnte eine Diffusion von freiem Toxin nicht nachgewiesen werden, wenn dagegen eine frisch bereitete Mischung angewandt wurde, so diffundierte das Toxin hinab und die unteren Teile der festen gelatinösen Lösung enthielten zwei letale Dosen für Meerschweinchen. Eine solche Festigung der chemischen Bindung wird in der Immunitätslehre oft angenommen und entspricht tatsächlich dem Danysz-Phänomen.

Daher verlieren die stark toxischen Lösungen, denen das Toxin fraktionsweise zugesetzt worden ist, langsam ihre abnorme Toxicität und nach einiger Zeit (etwa 6 Stunden bei 37 °) sind sie nicht giftiger als entsprechende, nicht fraktionierte Mischungen. Die Versuche von Dungerns über Diphtherietoxin entsprechen in ihren allgemeinen Ergebnissen denen über Tetanolysin, so daß man allen Grund hat, in beiden Fällen dieselbe Ursache anzunehmen. Dasselbe kann von den andren Toxinen gesagt werden, bei denen der Danysz-Effekt beobachtet worden ist, aber die experimentellen Daten sind hier äußerst mager.

Portier und Richet[1]) haben eine merkwürdige Erscheinung beobachtet, die zuerst ziemlich unerklärlich erscheint, indessen dem Danysz-Phänomen sehr ähnlich ist und deshalb auf analoge Weise erklärt werden kann. Sie bereiteten eine Lösung des Giftes, das in den Geweben von Cölenteraten wie Actinia und Physalis enthalten ist, und das ebenso wirkt wie das Gift der Urtica, indem sie diese Gewebe in Glycerin und Wasser mazerierten. Das Gift wurde in die Venen von Tauben oder Hunden eingespritzt und erzeugte einen starken Schlaf, weshalb es Hypnotoxin genannt wurde. Größere Dosen rufen den Tod unter Symptomen von Asphyxie hervor. Die Experimentatoren hofften auf die gewöhnliche Weise ein Antitoxin darstellen zu können, indem sie steigende Dosen in die Venen der Versuchstiere einspritzten. Aber sie hatten keinen Erfolg, denn: „Wenn ein Tier in einer ersten Injektion a Teile Gift und in einer

[1]) Portier und Richet, Bulletin du musée océanographique de Monaco, 25. Dez. 1905, Nr. 56.

Digitized by Google

zweiten b Teile erhält, so stirbt es fast augenblicklich nach der zweiten Injektion, während ein Tier, dem die Dosis a + b auf einmal eingespritzt wird, keine besonders schweren Vergiftungserscheinungen zeigt, und sich bald erholt."

Kapitel 7: Neutralisation von Diphtherietoxin, Ricin, Saponin und Schlangengiften.

Ganz ähnlich, wie Tetanolysin, verhält sich das praktisch wichtigste Toxin, das Diphtherietoxin. Da es in großem Maßstab dargestellt und geprüft worden ist, ist es der Gegenstand vieler Versuche gewesen. Unglücklicherweise sind bei den meisten dieser Versuche nur einige wenige (4—6) Punkte der Neutralisationskurve bestimmt worden und keine Anhaltspunkte über die Größe der Versuchsfehler gegeben. Das beruht natürlich darauf, daß die quantitative Seite dieser Wissenschaft noch in den ersten Anfängen ihrer Entwicklung ist. In einer Abhandlung aus dem Jahre 1903 gab Madsen[1]) eine größere Anzahl von Messungen, als gewöhnlich ausgeführt werden, für einige Diphtheriegifte. Als Beispiel mögen die Werte angeführt werden, die für das Gift Nr. 471 im Februar-März 1902 (5 Monate alt) und im November desselben Jahres (14 Monate alt) gefunden wurden. Die Buchstaben n und T haben dieselbe Bedeutung, in der sie oben beim Tetanolysin angewandt worden sind, nämlich Menge des zugesetzten Antitoxins und Toxicität.

Gift 471. Februar-März 1902.		
n	T beob.	T ber.
0	50	67
0,05	50	58
0,1	45	48
0,15	40	40
0,2	30	31
0,25	20	23
0,3	15	15
0,35	10—8	9
0,4	6	5
0,45	3	3

Gift 471. November 1902.		
n	T beob.	T ber.
0	35	67
0,06	35	56
0,12	35	45
0,18	35	36
0,24	18	25
0,30	14	15
0,36	8	8
0,40	7	5
0,48	3	3
0,56	1	2
0,60	1	1

Wie man aus diesen Zahlen sieht, scheint der Zusatz der ersten Antitoxinmengen die Toxicität des Giftes nicht zu verringern; die

[1]) Madsen, Zentralblatt f. Bakteriologie, 1903, 630 u. f.

Digitized by Google

beobachtete Toxicität bleibt konstant und der Abfall von $T_{beob.}$ beginnt erst, wenn die Antitoxinmengen 0,05 bzw. 0,18 zugesetzt sind. Hieraus schloß Madsen — in Übereinstimmung mit Ehrlich[1]) — daß ein Teil der antitoxinbindenden Substanz nicht giftig ist, und daß er Antitoxin bindet, ehe das Toxin selbst reagiert. Solch eine Substanz heißt nach Ehrlich Prototoxoid. Da die Menge n, die zur Hervorrufung einer wahrnehmbaren Abschwächung der Toxicität erforderlich ist, bei dem alten Gift größer als bei dem frischen war, so wurde der Schluß gezogen, daß die Prototoxoidmenge mit der Zeit wächst, und vielleicht das ganz frische Gift frei von allem Prototoxoid ist.

Das alles stimmte vollkommen mit Ehrlichs Anschauungen überein, aber in einem andren Punkte schloß sich Madsen nicht an Ehrlich an, was nämlich die Existenz sogenannter Toxoide betrifft. Wie die angeführte Tabelle erkennen läßt, ist das Ehrlichsche Phänomen hier sehr ausgesprochen, dieselbe Antitoxinmenge ruft bei Beginn der Neutralisation einen viel größeren Abfall der Toxicität hervor als später. Das ist zu erklären aus dem chemischen Gleichgewicht zwischen Toxin und Antitoxin einerseits und den Reaktionsprodukten andrerseits, wie die berechneten Zahlen zeigen. Sie sind nach derselben Gleichung berechnet, die für die Neutralisation des Tetanolysins gilt; nur ist die Gleichgewichtskonstante hier etwa 8 mal niedriger als dort, d. h. mit andren Worten, die Reaktion geht bei der Bindung des Diphtherietoxins viel weiter, als bei der Bindung des Tetanolysins.

Wenn die Toxicität unter 1 sinkt, so sterben die Versuchstiere nicht mehr nach Injektion der angewandten Giftmenge (0,1 ccm). Wenn man größere Dosen nimmt, so kann man die Tiere noch töten. Aber wenn die Antitoxinmenge einen gewissen Wert überschreitet, so sterben die Tiere nicht mehr (nach kurzer Zeit, 8 Tagen), sondern zeigen andre Krankheitssymptome. Nach einer Inkubationszeit von über einer Woche tritt Paralyse ein. Nun zeigten Madsen und Dreyer[2]), daß solche Paralyse (Paresis) auch manchmal nach Injektion einer Dose von reinem Diphtheriegift, die geringer ist als die letale, auftritt. Das freie Gift, subkutan injiziert, gibt andre Symptome, nämlich Nekrose und Haarausfall (Alopecie) rund um die Impfstelle. Ehrlich und seine Schüler wenden nun ein, daß bei Mischungen von Toxin und Antitoxin, die das Tier nicht töten, sondern Paresis erzeugen, die lokale Wirkung an der Impfstelle viel schwächer ist, als nach Injektion der entsprechenden Menge freien Giftes, während

[1]) Ehrlich, Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 38; 1903, 31. Aug., 7. Sept. u. 14. Sept.

[2]) Dreyer u. Madsen, Festskrift Kopenhagen 1902, Nr. 5.

Digitized by Google

die Paralyse umgekehrt bei der Mischung stärker als beim freien Gifte ist, und daher will man die paralytische Wirkung einem Gifte, Toxon oder Epitoxin, zuschreiben, das nach der Neutralisation des wahren Toxins übrig bleibt. Nach Madsen beruht der Unterschied darauf, daß der größte Teil des freien Giftes in der Nähe der Impfstelle gebunden wird. Der Rest, der ins Blut übergeht, ist daher verhältnismäßig unschädlich. Gänzlich verschieden verhält sich die Mischung. Während der größte Teil ihres freien Giftes in der Nähe der Impfstelle gebunden wird, diffundiert die Verbindung in die Venen, dissoziiert sich dort, gibt neue Giftmengen ab und erzeugt daher eine viel stärkere Paralyse als die kleine Menge freien Giftes. Ferner wurde z. B. beim Gift Nr. 471 dem Tiere einmal eine letale Dosis, das andre Mal 40 letale Dosen, gemischt mit einer großen Menge Antitoxin, eingespritzt; es muß zugegeben werden, daß es für das Tier im zweiten Fall viel schwieriger ist, seinen Körper von dem Gift zu befreien, als in dem ersten. Denn im ersten Fall hat es weniger als eine letale Dosis auszuscheiden, im zweiten Fall bilden sich, wenn eine letale Dosis beseitigt ist, neue Giftmengen und müssen aus dem Körper ausgeschieden werden. Unterdessen mögen genügend große Giftmengen, um starke Paralyse hervorzurufen, in die zentralen Organe diffundieren und ihre Funktionen stören. Von diesem Gesichtspunkt aus ist auch die lange Inkubationszeit leicht zu verstehen. Es ist daher kein genügender Grund vorhanden, im Diphtherietoxin die Gegenwart eines von dem tödlichen Gifte verschiedenen Giftes, wie Ehrlichs Toxon oder Epitoxin, anzunehmen.

Es sind in neuerer Zeit eine große Anzahl Experimente angestellt worden, um die Existenz der Toxone wahrscheinlich zu machen. Morgenroth[1]) hat eine sehr gut durchgearbeitete Studie über die Wirkung von reinem Diphtherietoxin und seinen Mischungen mit Antitoxin auf Meerschweinchen veröffentlicht. Er wies die Verschiedenheit in der Wirkung reinen Toxins und einer Mischung von Toxin und Antitoxin nach, so daß über diesen Punkt kein Zweifel mehr herrscht. Aber es ist auch kein Zweifel, daß sich dieser Unterschied ebensogut aus der Gegenwart von Reaktionsprodukten des Toxins und Antitoxins in der Lösung erklären läßt, wie durch die Annahme verschiedener Gifte.

Auch ein Versuch van Calcars[2]) wird von den Schülern Ehrlichs, die seine Ansichten zu verteidigen suchen, viel zitiert. v. Calcar glaubte gefunden zu haben, daß es mittels Diffusion unter Druck möglich ist, das Diphtheriegift von dem begleitenden Toxon zu trennen.

[1]) Morgenroth, Zeitschr. f. Hygiene, 48, 177 (1904).
[2]) v. Calcar, Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 39.

Digitized by Google

Dieses sollte nicht imstande sein, durch eine Membran zu gehen, die für das Gift selbst durchlässig war.

Römer[1]) hat v. Calcars Versuch wiederholt und gefunden, daß es unmöglich war, „den geringsten Unterschied zwischen dem ursprünglichen Diphtheriegift und seinen Diffusionsprodukten zu entdecken". Ferner unterwarf er v. Calcars Resultate einer kritischen Prüfung und stellte fest, daß die Versuche den Schluß, daß sich Toxone vom Diphtherietoxin trennen lassen, nicht rechtfertigen. v. Calcar hat selbst seine Abhandlung als eine vorläufige Mitteilung bezeichnet und die Schüler Ehrlichs, die sie zitieren, scheinen sie keiner Kontrolle unterworfen zu haben. In Madsens Laboratorium hat Walbum den Versuch v. Calcars gründlich untersucht und kommt zu denselben Resultaten wie Römer, so daß kein Zweifel zu sein scheint, daß mittels Diffusion unter den von v. Calcar angewandten Bedingungen Toxon von Diphtherietoxin nicht getrennt werden kann.

Aber auch die Existenz des Prototoxoides scheint nicht bewiesen, wenn wir das experimentelle Material einer näheren Analyse unterwerfen. Bei Betrachtung des Materials von Madsen fiel mir auf, daß es nicht so ausgiebig zur Rechnung benutzt worden ist, wie es möglich gewesen wäre. Eine Neuberechnung nach den Regeln, die in der exakten Wissenschaft üblich sind (vgl. S. 11), ergab beim Gift Nr. 471 (Versuche vom November 1902) eine Neutralisationskurve, die die Gegenwart von Prototoxoid nicht anzeigte. Ich nahm daher eine Neuberechnung aller Daten vor, die sich auf die von Madsen untersuchten Gifte bezogen. Für das Gift Nr. 471 fand ich folgende Resultate:[2])

Februar 1902			November 1902			September 1903		
n	$T_{beob.}$	$T_{ber.}$	n	$T_{beob.}$	$T_{ber.}$	n	$T_{beob.}$	$T_{ber.}$
0	100	100	0	100	100	0	100	100
0,05	74,4	87,5	0,06	79,3	86,5	0,1	75,1	75,1
0,1	72,8	75,1	0,12	76,0	73,2	0,15	62,6	62,7
0,15	57,6	62,7	0,18	64,7	59,9	0,2	47,6	50,6
0,2	49,8	50,6	0,24	50,9	46,6	0,25	45,8	38,6
0,25	32,2	38,6	0,3	39,1	34,0	0,3	25,9	27,3
0,3	28,0	27,3	0,36	23,1	22,4	0,35	17,3	17,5
0,35	17,2	17,5	0,4	14,8	15,7	0,4	9,6	9,9
0,4	11,1	9,9	0,48	8,3	7,0	0,45	5,3	6,0
0,45	5,6	6,0	0,54	2,5	4,5	0,5	3,1	4,1
0,5	1,2	4,1	0,6	2,6	3,0	0,6	1,6	2,6
Absolute Toxicität: 4,2			Absolute Toxicität: 2,86			Absolute Toxicität: 2,14		

[1]) Römer, Behrings Beitrage zur experimentellen Pathologie, 1904.

[2]) Arrhenius u. Madsen, Oversigt over d. danske Vid.-Selsk. Fork. 1904, Nr. 4, S. 269.

Digitized by Google

Die Gleichgewichtskonstante war unverändert $\varkappa = 0{,}012$ geblieben. Keine Spur von Prototoxoiden kann mit Hilfe der Rechnung entdeckt werden. Dasselbe gilt für zwei andre Gifte, A und C, die früher von Madsen untersucht worden sind, in denen er die Gegenwart großer Prototoxoidmengen annahm. Wenn im Gift Nr. 471 Prototoxoid vorhanden gewesen wäre, so müßte es sich am deutlichsten in der letzten Versuchsreihe (Sept. 1903) zeigen, wo das Gift ziemlich alt war. Aber gerade hier ist die Übereinstimmung zwischen Beobachtung und Rechnung, bei der keine Anwesenheit von Prototoxoid vorausgesetzt wurde, für kleine Werte von n besonders gut. Die Prototoxoid-Hypothese scheint daher unhaltbar. Aber andrerseits war die Giftwirkung von Nr. 471 in den 19 Monaten beträchtlich gesunken, nahezu auf die Hälfte der ursprünglichen Giftigkeit, ohne daß sich das Bindungsvermögen für Antitoxin geändert hätte. Wir nehmen daher mit Ehrlich an (vgl. S. 119), daß sich das Gift langsam in eine ungiftige oder weniger giftige Substanz verwandelt, die dasselbe Bindungsvermögen für Antitoxin hat wie das Toxin selbst. Diese neue Substanz nennt Ehrlich das Syntoxoid.

Die verschiedenen Diphtheriegifte unterscheiden sich voneinander durch ziemlich große Unterschiede ihrer Gleichgewichtskonstanten, z. B.: Nr. 471, $\varkappa = 0{,}012$; Gift A, $\varkappa = 0{,}03$; Gift C, $\varkappa = 0{,}004$. Es ist wohl notwendig, neue Versuche über diese interessante Frage und über das ähnliche Verhalten des Tetanolysins anzustellen, ehe eine endgültige Erklärung möglich ist. Man kann erklären, daß $\varkappa$ ziemlich verschiedene Werte hat, wenn man eine begleitende Substanz annimmt, die das Gift lose bindet oder absorbiert. So könnten sich in den Präparaten enthaltene Eiweißkörper verhalten. Es würde dann nur ein bestimmter Anteil des Toxins ins Gleichgewicht mit dem Antitoxin eingehen. Dieser Anteil ist in verschiedenen Präparaten des Diphtherietoxins verschieden, je nach dem wechselnden Gehalt an reagierenden Albuminoiden, und je kleiner dieser Anteil ist, desto größer wird sich die Gleichgewichtskonstante ergeben.

Diese Auffassung wird durch eine Beobachtung von Madsen und Noguchi an einem anderen Gifte, nämlich dem Crotalus-Venom, gestützt, wonach dessen $\varkappa$ verschieden ist, je nachdem es Kaninchen oder Meerschweinchen injiziert wird,[1] aber vielleicht beruht dieser Unterschied nur auf der verschiedenen Injektionsweise (intravenös resp. intraperitoneal).

Ebenso verhält sich nach den Untersuchungen von Madsen

[1] Madsen, Brit. Med. Journal, Sept. 1904 S. 14.

Digitized by Google

und Walbum das Ricin und sein Antikörper, was die agglutinierende Wirkung von Ricin auf rote (Kaninchen-) Blutkörperchen betrifft. Die agglutinierende Wirkung des Ricins wurde gemessen, indem die Durchsichtigkeit einer Emulsion roter Blutkörperchen beobachtet wurde, von der 2 ccm mit 5 ccm der Ricinlösung gemischt und darauf 20 Minuten bei 37° C gehalten wurden. Als Beispiel mögen folgende Zahlen gelten.

n =	0	0,025	0,035	0,045	0,055	0,065	0,075	0,087	0,1
$T_{beob.}$ =	6,7	6,7	3,6	2,1	1,5	1,0	0,8	0,64	< 0,5
$T_{ber.}$ =	(19,7)	6,8	3,6	2,1	1,4	1,0	0,8	0,63	0,52

Ein ccm Antiricin (bereitet durch Injektion in eine Ziege) war äquivalent mit 29 ccm der angewandten Ricinlösung (enhaltend 1% eines Ricinpräparates von Merck). Die Gleichgewichtskonstante $\varkappa$ war 0,0537. Die Formel ist dieselbe, wie die für Tetanolysin benutzte.

Aus diesen Zahlen sieht man, daß das Prototoxoid-Phänomen sehr ausgesprochen ist. Keine merkliche Neutralisation tritt ein, bis etwa 0,75 Äquivalente Antitoxin zugesetzt sind. Aber diese Erscheinung war „sehr schwankend und nur bei der Hälfte der untersuchten Fälle zu beobachten". Es gelang den Verfassern nicht, aufzuklären, welche zufälligen Umstände diese Erscheinung beim Ricin hervorriefen. Bei einigen Versuchen trat sie auf, während andre Versuche, ausgeführt mit denselben Präparaten, am selben Tag, mit demselben Pferdeblut, kein Anzeichen für die Gegenwart von Prototoxoid gaben.

Als Beispiel für ein Ricin, das die Prototoxoidzone nicht zeigt, mögen folgende Zahlen von Madsen und Walbum[1]) dienen.

n	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
$T_{beob.}$	100	88	73	63	44	27,3	15,9	11,9	7,1
$T_{ber.}$	100	86	72	58	44	31,3	19,4	11,0	6,4

Hier ist die Gleichgewichtskonstante nur 0,014. Madsen und Walbum fanden, daß die Stärke des Antiricins beständig sank, sie ging in 47 Tagen von 1 auf 0,4 und in weiteren 42 Tagen auf 0,196 zurück, was nahezu einer monomolekularen Reaktion entspricht (vgl. S. 31). Gleichzeitig sank die Gleichgewichtskonstante im Verhältnis 0,0537 : 0,0142.

Das Ricin hat noch eine andre toxische Wirkung. Bei subkutaner Injektion tötet es Meerschweinchen schon in sehr geringen Dosen. Madsen und Walbum bestimmten die letale Dose zu 0,000 123 g. Die Toxicität wird durch die reziproke Zahl 8130 aus-

[1]) Madsen u. Walbum, Zentralbl. f. Bakteriologie, Abt. I, 36, 242 (1904).

Digitized by Google

gedrückt. Madsen und Walbum nahmen eine 200 mal geringere Giftmenge (40,7 = 0,005 g), setzten verschiedene Antiricinmengen zu, schwankend zwischen 0,01 und 0,035 ccm, hielten die Mischung 20 Minuten bei 37°, und spritzten sie darauf Meerschweinchen ein. Sie fanden folgenden Gehalt an letalen Dosen in den verschiedenen Mischungen:

Toxicität von Gemischen von Ricinnervengift und Antiricin.

n = ccm	$T_{beob.}$	$T_{ber.}$
0	40,7	40,7
0,01	25	25,6
0,0125	21	22
0,015	17	18,6
0,02	12	12,2
0,0225	9	9,5
0,025	7	7
0,0275	5	5
0,03	4	3,5
0,0325	3	2,7
0,035	2	1

Die benutzten Werte sind: p = 40, d. h. 0,025 ccm des Antiricins sind äquivalent mit 0,005 g des Ricins. $\varkappa$ ergab sich zu 0,00149 und die Formel war

$$\text{(Konzentration des freien Ricins) (Konzentration des freien Antiricins)} = \varkappa \text{ (Konzentration des gebundenen Ricins)}^{\frac{3}{2}}$$

Die berechneten Werte stimmen sehr gut mit den beobachteten überein. Die Gleichung sagt aus, daß zwei Moleküle Ricin und zwei Moleküle Antiricin zu drei Molekülen ungiftiger Substanzen zusammentreten.

Wir müssen daher annehmen, daß wahrscheinlich noch ein andres Gift in den Ricinpräparaten enthalten ist und die Tiere tötet, als das, was die roten Blutkörperchen agglutiniert. Die Annahme Ehrlichs,[1]) daß die Wirkung des Ricins in vitro von derselben Art ist wie in dem lebenden Tier, bestätigt sich daher nicht bei quantitativer Prüfung.

Daß diese beiden Gifte nicht identisch sind, war bekannt, aber es wäre möglich gewesen, daß sie stets in konstanter Proportion zugegen wären. Daß dies nicht der Fall ist, zeigte Bashford.[2])

---

[1]) Ehrlich, Fortschritte d. Medizin, 1897, Nr. 2.
[2]) Bashford, Journal of Hygiene, 4, 56 (1904).

Digitized by Google

Normales Kaninchenserum beeinträchtigt die agglutinierende, aber nicht die neurotoxische Wirkung des Ricins.

Ebenso wie das Nervengift im Ricin verhält sich, nach einer Untersuchung von Madsen und Noguchi,[1]) das hämolytische Gift Saponin. Die Verfasser studierten den Einfluß verschiedener Mengen von Blutkörperchen. Die Versuche wurden in der gewöhnlichen Weise ausgeführt, indem eine gegebene Menge (2 ccm einer 2 prozentigen Lösung) des Giftes (Saponin), eine bestimmte Menge des Antitoxins (Cholesterin) und soviel physiologische Salzlösung, daß die ganze Menge 4 ccm betrug, gemischt wurden.

Neutralisation von 0,04 g Saponin mittels n ccm einer 0,1-n Cholesterinlösung.

n	Blutemulsion von			Toxicität	
	1,25 %	2,5 %	5 %	mittlere	ber.
0	100	100	100	100	95,2
0,01	79,5	82,4	79,3	80,4	78,5
0,015	67,5	71,0	71,8	70,1	71,5
0,02	54,6	57,6	62,1	58,1	62,9
0,025	48,1	53,1	56,0	52,4	55,6
0,03	44,0	45,4	48,3	45,9	48,3
0,04	34,5	41,0	40,6	38,7	35,4
0,05	26,7	33,4	29,3	29,8	24,4
0,06	17,7	21,2	18,1	19,0	15,7
0,07	11,1	12,8	9,4	11,1	9,8
0,08	7,8	6,7	4,3	6,3	6,1
0,1	3,7	3,2	2,4	3.1	2,8
0,12	1,7	1,4	1,2	1,5	1,4
0,14	0,67	0,62	0,51	0,6	0,8
0,16	0,34	0,43	0,42	0,4	0,5

0,053 ccm der Cholesterinlösung sind äquivalent mit 0,04 g Saponin oder 1 ccm mit 0,76 g. Danach muß das Molekulargewicht des Saponins 7600 sein, wenn man annimmt, daß ein Gramm-Molekül Cholesterin ($C_{27}H_{46}O = 386$) gleich einem Gramm-Äquivalent ist und dasselbe für das Saponin gilt, das als rein angesehen wird.

Die verschiedenen Blutemulsionen (Pferdeblut), deren Konzentration im Verhältnis 1 : 4 variiert, geben innerhalb der Versuchsfehler denselben Wert der Toxicität.

Das scheint darauf hinzuweisen, daß die Absorption eines Teiles des Giftes in den Erythrocyten das Gleichgewicht nicht stört. Der Grund davon ist wahrscheinlich, daß die von den Erythrocyten absorbierte Giftmenge unbedeutend gegen die in der umgebenden Lösung ist. Die Saponin-Cholesterinreaktion wurde für diese besondere Unter-

[1]) Oversigt Danske Vidensk. Selsk. Förh. 1904, 457.

Digitized by Google

suchung ausgewählt, weil ihre Geschwindigkeit so groß ist, daß sie nach den gewöhnlichen Methoden nicht mehr gemessen werden kann. Das Saponin (in 2 prozentiger wässeriger Lösung) und das Cholesterin (in 0,1 n = 3,86 prozentiger ätherischer Lösung) wurden gemischt und 3 Stunden lang bei 37° gehalten. Der Äther, der während dieser Zeit nicht verdampft war, wurde im Vakuum entfernt, worauf so viel Salzlösung zugesetzt wurde, daß die Konzentration des Saponins in der Lösung 1% betrug.

Dann wurden die zu untersuchenden Mengen dieser Mischungen in Probierröhrchen gebracht und so viel Salzlösung zugesetzt, daß das ganze Volumen 2 ccm war, worauf 8 ccm der Blutemulsion rasch zugegossen wurden und die Röhrchen durchgeschüttelt wurden. Dann kamen sie drei Stunden lang in einen Brutschrank von 37°, dann in einen Eisschrank und wurden am folgenden Tage in gewöhnlicher Weise geprüft.

Das Gleichgewicht hatte daher reichlich Zeit, sich nach der Beimischung der Erythrocytenemulsion wieder einzustellen. Wenn die Anwesenheit der Erythrocyten einen störenden Einfluß hätte, hätte er daher hier sehr deutlich hervortreten müssen, besonders da auch die Erythrocytenmenge in einem Fall doppelt so groß war als bei den Operationen im allgemeinen. Aber die Zahlen der letzten Tabelle zeigen keinen derartigen Einfluß, und wir dürfen wohl schließen, daß der störende Einfluß der Löslichkeit des Giftes in den Erythrocyten bei diesen und ähnlichen Versuchen vernachlässigt werden kann.

Einige Versuche mit normalem Pferde- und Ochsenserum ergaben dasselbe Resultat, wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht, in der die berechneten Werte unter der Annahme gefunden sind, daß 1 ccm normalen Ochsenserums äquivalent mit 0,006 g Saponin ist.

Neutralisation von 0,002 g Saponin durch n ccm normales Ochsenblutserum.

n	q beob.	q ber.
0	100	100
0,1	80,5	79,4
0,15	70,6	71,7
0,2	62,8	64,5
0,3	52,1	52,2
0,4	44,4	42,5
0,5	35,3	34,4
0,6	28,3	27,9
0,8	18,6	18,6
1,0	10,7	13,2

Die Gleichung, die der Rechnung zugrunde liegt, ist dieselbe, wie im letzten Falle.

Digitized by Google

Madsen und Noguchi haben eine Untersuchung[1]) ausgeführt, die sich mit der Neutralisation verschiedener Schlangengifte durch ihre Antikörper befaßt. Diese sind spezifisch, d. h. sie reagieren nur mit dem bestimmten Gift, das für die Injektion verwandt wurde. Das Cobraantitoxin war aus Pferdeblut, die zwei anderen Antitoxine aus Ziegenblut gewonnen worden. Die Schlangengifte enthalten verschiedene Gifte, von denen einige hämolytisch sind, andere hauptsächlich auf das Nervensystem reagieren und tödlich für Tiere sind. Die Antikörper neutralisieren sowohl die Lysine wie die anderen Gifte.

Die Lysine der Schlangengifte verhalten sich bei der Neutralisation nahezu wie starke Basen, die Gleichgewichtskonstante ist fast null. Hiermit stehen die Resultate älterer Versuche von Kyes in bester Übereinstimmung.

Folgende Tabellen geben die Einzelheiten wieder. Die Gifte und ihre Antikörper wirkten 3 Stunden bei 37° aufeinander, das ganze Volumen war bei jeder Mischung stets gleich. Nach der Reaktion wurden 8 ccm Blutemulsion zugegeben.

Neutralisation von 1 ccm 0,05 prozentigem Crotaloysin mittels n ccm Antivenin (5 % Hundeblut).

n	q beob.	q ber.
0	100	100
0,05	89	91
0,1	77	81
0,15	71	72
0,2	64	63
0,25	54	53
0,3	46	44
0,35	36	35
0,4	24	26
0,45	16	16
0,5	6,3	7
0,55	1,5	0

Die untersten Zahlen zeigen, daß die freie Giftmenge größer ist, als sich berechnet, wenn $x = 0$ gesetzt wird; x hat also einen endlichen Wert. Wenn wir x hieraus berechnen, indem wir 1 ccm Antivenin äquivalent 1,86 ccm Lysin annehmen, so finden wir $x = 0{,}0006$, unter Benutzung derselben Gleichung wie für Tetanolysin.

Bei folgenden Versuchen mit Cobralysin wurden je 8 ccm $\frac{1}{100}$ n Lecithin zu 1000 ccm Pferdeblutemulsion zugesetzt.

[1]) Noch unveröffentlicht.

Digitized by Google

Neutralisation von 1 ccm 0,1 prozentigem Cobralysin mittels n ccm Antivenin (1 % Pferdeblut).

n	q beob.	q ber.
0	100	100
0,1	84	83
0,15	71	75
2	65	66
0,25	56	58
0,3	44	50
0,4	33	33
0,5	16	16
0,6	3,3	0

Hier ist 1 ccm der Antiveninlösung äquivalent mit 1,68 ccm des Giftes. Die letzte Beobachtung ergibt $\varkappa = 0{,}0014$.

Neutralisation von 1 ccm Lysin aus Ancistrodon piscivorus (5 % Hundeblut).

n	q beob.	q ber.
0	100	100
0,05	93	94
0,1	87	88
0,15	82	82
0,2	77	76
0,25	70	70
0,3	63	64
0,4	53	52
0,5	42	40
0,6	26	28
0,7	17	16
0,8	11	4
1	2	0

Hier ist die Abweichung von den berechneten Zahlen noch größer als in den zwei vorhergehenden Fällen. $\varkappa$ ist etwa 0,006, oder etwas größer als bei dem Diphtheriegift, das den kleinsten Wert von $\varkappa$ (= 0,004) aufweist. Aus diesen Versuchen folgt, daß die Behauptung von Kyes und Sachs, die Neutralisationskurve des Cobralysins sei ganz gradlinig (entsprechend $\varkappa = 0$), nicht exakt ist. Auch die eigentümlichen Schlüsse, die diese Verfasser aus ihren nicht ganz genauen Beobachtungen gezogen haben, werden hinfällig. Selbst wenn die Kurve ganz gradlinig wäre, wäre es doch unerlaubt zu schließen, daß die Abweichung von der graden Linie die Anwesenheit von Toxoiden und Toxonen anzeigt (vgl. das Verhalten des Ammoniaks). Es ist auch bemerkenswert, daß Kyes keine Versuche mit Mischungen gemacht hat, die einen Überschuß von Antilysin enthalten, oder wenigstens sie nicht erwähnt hat.

Digitized by Google

Morgenroth[1]) beschreibt einen Versuch, den er mit Cobralysin ausgeführt hat. Das Gift war mit etwas mehr als dem Doppelten der äquivalenten Menge Antivenin gemischt und Lecithin war zugegen. Diese Mischung (in 10 ccm physiologischer Salzlösung) wurde 3 Stunden lang bei 37° mit Kaninchenerythrocyten zusammengehalten, darauf wurde die Flüssigkeit durch Abschleudern von den Erythrocyten getrennt und ihr Gehalt an Cobragift bestimmt. Wie gewöhnlich wird über die Größe der Versuchsfehler nichts angegeben, wir wollen sie sehr niedrig zu 5% ansetzen. Morgenroth fand, daß „absolut" (!) kein Cobragift von den Erythrocyten absorbiert worden war. Die richtige Schlußfolgerung wäre natürlich gewesen, daß weniger als 5% des Giftes entfernt waren. Eine Berechnung mit Hilfe der auf S. 138 gegebenen Zahlen ($x = 0{,}0014$) ergibt, daß etwa 0,1% des Giftes frei in der Flüssigkeit vorhanden waren. Wenn die Erythrocyten das Zehnfache dieser Menge absorbiert hätten, so wäre es noch immer fünfmal weniger gewesen, als die kleinste Menge, die Morgenroth imstande war, zu entdecken. Vielleicht absorbieren die Erythrocyten hier auch das Antitoxin.

Es ist wirklich eigentümlich, daß Morgenroth gerade diese Verbindung gewählt hat, um zu entscheiden, ob eine partielle Dissoziation vorkommt, da es durch Kyes' Versuche wohl bekannt war, daß sie äußerst wenig (Kyes behauptete gar nicht) dissoziert ist, und ferner ist merkwürdig, daß Morgenroth einen so großen Überschuß von Antitoxin angewandt hat, und so die an sich unbedeutende Dissoziation noch weiter heruntergedrückt hat. Morgenroth hätte weit stärker dissozierte Verbindungen anwenden können, ohne daß es ihm gelungen wäre, mit Hilfe seiner Versuchsmethode Dissoziationsprodukte zu entdecken.

Was die Nervengifte der Schlangen betrifft, so mögen Versuche angeführt werden, bei denen die Gifte Meerschweinchen interperitoneal eingespritzt wurden. Die Beobachtungen und Berechnungen wurden wie beim Diphtheriegift gehalten. Folgende Werte wurden erhalten:

Neutralisation von 0,006 g Crotalusgift mittels n ccm Antivenin.

n	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$
0	100	100
0,25	75	75
0,5	58	54
0,75	38	43

[1]) Morgenroth, Arbeiten aus dem pathologischen Institut zu Berlin, 1906, S. 11. Vgl. die Versuche Madsens und Walbums mit Ricin, gegen die Morgenroth seine Versuche als Gegenargument benutzen will (S. 16).

Digitized by Google

Neutralisation von 0,006 g Crotalusgift mittels n ccm Antivenin.

n	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$
1,0	29	31
1,25	21	21
1,5	14	15
1,75	12	10
2,0	8	7
2,25	4	4

Hier ist 1 ccm Antitoxin äquivalent 0,006 g Crotalusgift. Die Gleichgewichtsgleichung zeigt, daß sich drei Moleküle Reaktionsprodukte aus zwei Molekülen Toxin und zwei Antitoxin bilden. Die Konstante $\varkappa = 0{,}048$.

Das Cobragift wurde ebenso angewandt, es gab folgende Zahlen, die zu wenig zahlreich für eine Rechnung sind, aber immerhin darauf hinweisen, daß sich das Gift etwa wie Crotalusgift verhält.

n	= 0	1	2	3	4 ccm Antitoxin auf 0,003 g Gift
$q_{beob.}$	= 100	64	36	14	9

Sehr merkwürdige Resultate ergaben die Versuche über die Neutralisation des Giftes der Wasserlanzenschlange (Ancistrodon piscivorus). Hier sank die Toxicität zu einem Minimum und stieg dann wieder, wie folgende Zahlen zeigen:

Neutralisation von Gift der Wasserlanzenschlange (0,012 g) mittels n ccm Antitoxin.

n	0	2	4	5	6	8	9	10	20	40
$q_{beob.}$	100	56	44	33	24	19	24	19(?)	36	65

Die Messungen scheinen darauf hinzuweisen, daß das Antitoxin, das den Meerschweinchen in ziemlich großen Mengen eingespritzt wurde (10 ccm beim letzten Versuch), gesundheitschädlich auf sie wirkte. Der große Verbrauch an Antitoxin verhinderte die weitere Durchführung der Versuche.

Wie wir im nächsten Kapitel sehen werden, vereinigt sich Cobragift mit Lecithin und bildet ein zusammengesetztes Cobralecithid von sehr kräftiger hämolytischer Wirkung. Kyes[1]) hat dieses Cobralecithid isoliert und ein Antitoxin dagegen dargestellt, indem er es in die Venen eines Kaninchens injizierte. Da normales Kaninchenserum an und für sich etwas antitoxisch gegen Cobralecithid ist, diese Eigenschaft aber verliert, wenn es 30 Minuten lang auf 64° erhitzt wird, so wurde das Immunserum einer solchen Erhitzung unterworfen, wobei das spezifische Antitoxin unverändert bleibt. Mit diesem

[1]) Kyes, l. c. S. 8.

Digitized by Google

Cobralecithid und seinem Antikörper machte Kyes einige Versuche an Ochsenerythrocyten, deren Resultate in folgender Tabelle zusammengestellt sind:

Neutralisation von 4 cc Cobra-Lecithid-Lösung durch n cc Antitoxin.

n	n_1	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$	
0	0	100	100	
1	0,4	65,7	64,8	
2	0,8	39,2	41,1	$x = 0{,}25$
3	1,2	28,1	27,6	
4	1,6	21,2	20,0	

Die berechneten Zahlen, die sehr gut mit den beobachteten übereinstimmen, sind mit Hilfe der Gleichung berechnet, die für die Neutralisation des Tetanolysins gefunden wurde. Der hohe Wert der Konstanten zeigt, daß die Verbindung weit von Vollständigkeit entfernt ist, mit anderen Worten, daß die Neutralisationskurve erheblich von der geraden Linie abweicht.

Kyes und Sachs[1]) stellten fest, daß Cholesterin einen stark neutralisierenden Einfluß sowohl auf Cobralecithid wie Cobralysin hat. Auch gegen die hämolytische Kraft des Tetanolysins und Olivenöls offenbart sich diese Wirkung des Cholesterins, aber nicht gegen die des Staphylolysins und Arachnolysins.

Biltz[2]) hat die Neutralisation von arseniger Säure (As_2O_3) mittels „frisch gefällten Ferrihydrates" studiert. Dieses Hydrat hat eine Beschaffenheit wie Gelatine und eine absorbierende Kraft genau wie ein Kolloid. Biltz fügte die arsenige Säure in steigender Menge zu einer Emulsion von 10 cc des Hydrates in 200 cc Wasser und findet, daß die absorbierte Menge viel langsamer als die Konzentration der Flüssigkeit zunimmt. Die von dem Hydrat absorbierte Menge arseniger Säure ist nur der fünften Wurzel der Konzentration in der Lösung proportional. Diese Beobachtung steht in guter Übereinstimmung mit anderen Versuchen über ähnliche Gegenstände, für die Absorption mittels Tierkohle z. B. fand Schmidt die vierte Wurzel, was die allgemeine Regel bei den sogenannten Adsorptionsprozessen zu sein scheint.

Biltz findet, daß zwischen dieser Erscheinung und der Neutralisation von Toxinen durch Antitoxine eine sehr enge Analogie herrscht. Es ist sehr merkwürdig, daß Biltz seine Idee nicht an einem der damals schon veröffentlichten Beispiele, z. B. an den Be-

[1]) Kyes und Sachs, Berl. klin. Wochenschrift, 1903, Nr. 2—4.
[2]) Biltz, Ber. d. deutschen chem. Ges., 37, 3138 (1904).

Digitized by Google

obachtungen über die Neutralisation des Tetanolysins oder Diphtherietoxins, geprüft hat. Wenn ich Biltz recht verstehe, so sollte das Toxin der gelösten arsenigen Säure analog sein und das Antitoxin in kolloidalem Zustand sein und dem Eisenhydroxyd entsprechen.

Von diesem Gesichtspunkt aus habe ich die oben angeführten Zahlen nachgeprüft, die die Neutralisation von Tetanolysin mit Antilysin und Cholesterin, von Diphtheriegift mit Heilserum und von Saponin mit Cholesterin und Ochsenserum betreffen. In den ersten Fällen, wo die Reaktionsprodukte mit der zweiten Potenz in die Reaktionsgleichung eingehen, gibt die Gleichung von Biltz:

$$\text{Konz. d. freien Giftes} = \varkappa\ (\text{Konz. d. Giftes im Antitoxin})^p$$

einen Wert von p, der mit steigender Konzentration n des Antitoxins rasch sinkt. Bei Tetanolysin und Antilysin sinkt p von dem Werte 4,5 über 2,3 und 1,8 zu dem Endwert 1,3. Bei der Neutralisation von Tetanolysin mit Cholesterin sinkt p von einem unendlichen Wert auf 5,1. Beim Diphtheriegift 471 (Sept. 1903) sind die entsprechenden Werte: 150, 11, 7,3 und 4,3. Bei der Neutralisation von Saponin geht p durch ein Minimum. Mit Cholesterin gibt es die p-Werte 6,5, 3,1 und 5, mit Ochsenserum die Werte 5, 1,2, 2,8 und 4,1. Es kann daher nicht von der Möglichkeit die Rede sein, p als eine Konstante zu betrachten und die Hypothese von Biltz kann als unhaltbar angesehen werden.

Andererseits können wir unsere Erfahrung dahin zusammenfassen, daß sich die Gleichung von Guldberg und Waage:

$$(\text{Konz. d. Toxins})\,(\text{Konz. d. Antitoxins}) = \varkappa\ (\text{Konz. d. Reaktionsprodukte})^p$$

wo $p = 2$, 1,5 oder manchmal 1 ist, in allen untersuchten Fällen der Neutralisation von Giften durch Antitoxine bewährt hat.

Kapitel 8: Die zusammengesetzten Hämolysine.

In alten Zeiten pflegte man das Blut von Tieren in die Venen kranker Menschen zu therapeutischen Zwecken zu injizieren. Man fand bald, daß diese Transfusionsexperimente sehr gefährlich sind, da das Serum der Tiere eine „globulicide" Wirkung auf Erythrocyten menschlichen Ursprungs hat. Nur das Blut der gleichen Art ist unschädlich.[1])

[1]) Landois, Die Transfusion des Blutes (Leipzig 1875), zitiert nach Hans Sachs, Die Hämolysine, Lubarsch-Ostertags Ergebnisse d. pathol. Anatomie

Digitized by Google

Das normale Serum eines Tieres enthält irgend eine Substanz, die Erythrocyten anderer Spezies hämolysiert; Buchner nannte diese Substanz Alexin; er fand, daß sie bei Temparaturen von 55° und darüber rasch zerfällt.

Wenn ein Tier durch Einspritzungen von Erythrocyten einer anderen Art immunisiert wird, so nimmt die hämolytische Kraft seines Serums stark zu. Die hämolytische Wirkung ist dann spezifisch gegen die Erythrocyten derselben Spezies, von der die Injektion stammte. Diese Beobachtung geht auf Bordet[1]) zurück, der auch fand, daß die hämolytischen Eigenschaften verschwinden, wenn man 30 Minuten auf 55° erhitzt, aber wiederkommen, wenn man normales Serum zusetzt.

Die Wirkung dieses Immunserums wird durch frisches Serum gesteigert, wie Ehrlich und Morgenroth[2]) fanden, und die hämolytische Kraft des erhitzten Immunserums nach Zusatz von normalem Serum kann viele Male größer sein als die des frischen Immunserums vor der Erhitzung. Diese Beobachtungen führten, wie oben erwähnt (S. 14), zu der Ansicht, daß das Immunserum zwei Substanzen enthält, den sogenannten Immunkörper (oder Amboceptor), der bei 55° beständig ist, und das Alexin (Komplement), das auch in normalem Serum zugegen ist und bei 55° zerfällt.

Überdies enthält das Immunserum, wie Bordet fand, eine Substanz, die agglutinierend auf Erythrocyten von ähnlicher Herkunft wie die injizierten einwirkt. Dieses Agglutinin widersteht einer Erhitzung auf 60°, verliert aber sein Agglutinationsvermögen bei 70°.

Wie aus den S. 97 behandelten Versuchen hervorgeht, wird der Immunkörper von den Erythrocyten stark absorbiert. Wenn er in verhältnismäßig geringer Menge zugegen ist, so ist die Absorption praktisch vollständig. Wenn daher Erythrocyten mit ihrem spezifischen Immunserum, das zuvor erhitzt war, eine Stunde lang geschüttelt werden, so ist dieses Serum unschädlich für andere Erythrocyten geworden, selbst wenn Alexin zugesetzt wird. Die Erythrocyten dagegen, die den Immunkörper aufgelöst haben, können, nachdem man sie vom Serum getrennt hat, etwa durch Zentrifugieren, durch Zusatz eines Alexins aufgelöst werden.

Auf ähnliche Weise läßt sich zeigen, daß das Alexin in keinem merklichen Grade von den Erythrocyten absorbiert wird. Denn wenn

Bd. 7 (1902). Diese Abhandlung enthält eine Übersicht der Literatur und der bis zu dieser Zeit gewonnenen Ergebnisse.

[1]) Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur, 12 (1898).

[2]) Ehrlich und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1899, Nr. 22.

Digitized by Google

man sie eine Stunde lang mit Alexin schüttelt und darauf von der Flüssigkeit trennt, bleiben sie bei Zusatz des Immunkörpers intakt.

Ehrlich und Morgenroth[1]) haben einige Versuche über die Bindung von Immunkörper und Alexin beschrieben, die eine ausgedehnte Diskussion hervorgerufen haben und noch nicht befriedigend haben erklärt werden können. Wenn bei niedriger Temperatur (0—3°) die hämolytische Mischung der beiden Substanzen mit den spezifischen (Schaf-) Erythrocyten eine Stunde lang geschüttelt wurde, so wurde der Immunkörper (aus Ziegenserum) von den Erythrocyten absorbiert und das Alexin blieb allein in der Lösung zurück. Der Versuch gelingt auch z. T. bei 40°, wenn die Dauer der Berührung zwischen Lösung und Korpuskeln auf 10 Minuten beschränkt wird. Wenn die Korpuskeln dann in physiologischer Salzlösung emulsioniert werden, so beobachtet man eine mäßige Hämolyse, die zunimmt, wenn Alexin (normales Ziegenserum) zugesetzt wird.

Offenbar haben wir es hier mit einer Reaktionsgeschwindigkeit zu tun, und der Immunkörper spielt dabei etwa dieselbe Rolle, wie das Cholesterin in Ransoms Experimenten mit Saponin. Der Unterschied ist, daß der Immunkörper schnell und kräftig von den Erythrocyten absorbiert wird, was offenbar beim Cholesterin nicht der Fall ist. Bei niedriger Temperatur ist die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Immunkörper und Alexin unmerklich. Daher wird das Alexin, das ebenfalls, wenn auch in geringerem Grade, in die Blutkörperchen geht, von dem dort vorhandenen Immunkörper nicht in merklicher Menge gebunden. Bei höherer Temperatur dagegen bildet sich eine genügende Menge Hämolysin in den Erythrocyten, um eine Spur Farbstoff austreten zu lassen. Sobald das Alexin gebunden ist, diffundieren neue Mengen in die Erythrocyten nach. Daher nimmt die Hämolyse zu, wenn die Körperchen mit frischem Alexin behandelt werden. Andererseits fanden Ehrlich und Morgenroth in der Flüssigkeit, in der die Erythrocyten 1—2 Stunden bei 0° suspendiert gewesen waren, einen Gehalt von Alexin. So zeigten sie, daß auch die Hämolysine in normalem Serum, z. B. in Ziegenserum, das sie auf Meerschweinchenerythrocyten wirken ließen, aus der Vereinigung eines Immunkörpers und eines Alexins gebildet werden. Sie stellten auch fest, daß ein bestimmter Immunkörper mit verschiedenen Alexinen (normalen Seren verschiedener Tiere) Hämolysine von sehr verschie-

---

[1]) Ehrlich und Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr. 1899, Nr. 1. Gruber, Münch. med. Wochenschr. 1901, 43—43, 1904, Nr. 2. Morgenroth, Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 43 und 1904, Nr. 5.

Digitized by Google

dener hämolytischer Kraft gibt, was offenbar viele verschiedene Gründe haben kann.

Ehrlich und Morgenroth nehmen an, daß die Verbindung von Immunkörper und Alexin, d. h. das Hämolysin, in dem Flüssigkeitsgemisch gelöst vorhanden ist und so chemisch mit den Erythrocyten reagiert, die wie Moleküle aufgefaßt werden. Um das Ausbleiben der Reaktion bei 0° zu erklären, machen sie die Annahme, daß das Hämolysin bei niedriger Temperatur fast vollständig dissoziert ist, nicht aber bei 40°, was in sich schließt, daß die Vereinigung von Immunkörper und Alexin unter außerordentlich großer Wärmeabsorption erfolgt, eine sehr unwahrscheinliche Annahme. Die Membranen der Erythrocyten sind offenbar für das Hämolysin nur wenig durchlässig, daher hat nur das innerhalb dieser Membranen gebildete Hämolysin eine giftige Wirkung auf die Korpuskeln, genau wie bei Saponin und Cholesterin. Die Versuche lehren uns nichts über die Anwesenheit von Hämolysin in der Mischung von Immunkörper und Alexin.

In einigen seltenen Fällen scheint die Absorption des Immunkörpers in den Erythrocyten weit weniger vollständig zu sein, als in dem durch die Zahlen S. 97 erläuterten typischen Falle. Ehrlich und Sachs[1]) beschreiben einige Versuche über die Wirkung einer Mischung von inaktiviertem Ochsenserum und normalem Pferdeserum auf Meerschweinchenerythrocyten. Die Mischung bewirkt bei 37° in einer Stunde Hämolyse. Aber wenn die Erythrocyten eine Stunde bei 37° in dem Ochsenserum suspendiert, dann zentrifugiert und mit dem Pferdeserum gemischt werden, so ist keine Wirkung zu beobachten.

Ehrlich erklärt diese Beobachtung durch die Annahme, daß die Blutkörperchen keine Affinität zu dem Immunkörper haben, wenn er nicht an das Alexin gebunden ist. Das ist offenbar nur eine etwas gekünstelte Umschreibung und keine wirkliche Erklärung.

Darum wäre es natürlicher anzunehmen, daß die betreffenden Erythrocyten den Immunkörper nur in geringem Grade absorbieren, wogegen eine beträchtliche Aufnahme des Immunkörpers in den Erythrocyten stattfinden könnte, falls die in dieselben hineingetretenen Mengen des Immunkörpers sich mit hineindiffundiertem Alexin umsetzten. Nach einer unten (S. 170) näher besprochenen Untersuchung von Bordet und Gay ist aber eine andere Erklärungsweise vorzuziehen.

Die erste theoretische Anschauung dieser Erscheinungen wurde von Bordet[2]) gegeben, der den Immunkörper als eine Art katalyti-

[1]) Ehrlich und Sachs, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 21.
[2]) Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur 12, 688 (1898) und 14, 257 (1900).

Digitized by Google

sches Agens ansah, das die Erythrocyten für den Angriff des Alexins „sensibilisiert". Der Einwand, daß Alexin für sich allein die Erythrocyten nicht angreift, ist offenbar unhaltbar. Bordet führte seinen Versuch mit fraktioniertem Zusatz von Erythrocyten zu einer gegebenen Menge hämolytischen Serums zugunsten seiner Ansicht an (vgl. S. 23). Dieses Experiment beweist, daß die Bindung nicht in einem konstanten Verhältnis vor sich geht, wie Ehrlich stillschweigend voraussetzte. Aber Ehrlich antwortete, daß die Zellen mehr Hämolysin binden können, als die zur Farbstoffabgabe nötige Menge. Da wir jetzt wissen, daß der Immunkörper von den Erythrocyten absorbiert wird, hat diese Kontroverse nur noch historisches Interesse. In gewissem Sinne müssen wir Bordet recht geben, der Eintritt des Immunkörpers in die Erythrocyten ist die notwendige Bedingung des Angriffs durch das Alexin, das, wie wir später sehen werden, wirklich in äquivalenter Menge von dem in den Erythrocyten gelösten Immunkörper gebunden wird. Gegen Bordet ist auch der Versuch von Ehrlich und Sachs anzuführen, der sich leicht erklären läßt, wenn man im Auge behält, daß der Immunkörper absorbiert wird.

Ein Versuch von Neißer und Wechsberg[1]) scheint zu zeigen, daß Immunkörper und Alexin, wenn sie gemischt werden, wirklich eine Verbindung eingehen, wenigstens partiell. Sie benutzten verschiedene Bakteriolysine, die wie die Hämolysine zusammengesetzter Natur sind, so daß die Gegenwart zweier verschiedener Substanzen, eines Immunkörpers und eines Alexins, nötig ist. Sie arbeiteten mit einer konstanten Menge von Bakterien und Alexin, zu der sie verschiedene Mengen Immunkörper setzten. Dann nimmt mit der Konzentration des Immunkörpers die Wirkung, wie wir wissen, zunächst zu, kommt aber zu einem Maximum, und wenn die Menge einen bestimmten Wert überschreitet, nimmt sie wieder ab, so daß sogar die Bakterien unbeschädigt bleiben können. Diese Erscheinung ist als „Ablenkung" des Alexins bezeichnet worden. Da die Versuche mit Bakteriolysinen für quantitative Messungen nicht sehr geeignet sind, mögen die folgenden Versuche zur Aufklärung dienen, die mit Kaninchenserum als Immunkörper und Meerschweinchenserum als Alexin an Ochsenerythrocyten ausgeführt sind. In der folgenden Tabelle ist die in 2,5 ccm der Lösung anwesende Menge Alexin mit b, die entsprechende Menge des Immunkörpers mit a bezeichnet. Als Einheit dient der tausendste Teil der in 1 ccm der beiden Originalpräparate enthaltenen Menge. Die Erythrocytenmenge betrug 1 ccm

[1]) Neißer und Wechsberg, Münch. med. Wochenschr. (1901.)

Digitized by Google

einer 5prozentigen Emulsion von Ochsenblut. Die Mischung, die vorher 30 Minuten bei 24° gestanden hatte, wirkte zwei Stunden lang bei 37° auf die Erythrocyten. Auf diese Weise fand ich folgende Hämolysengrade (vollständige Hämolyse = 100):

Wirkung verschiedener Mengen von Immunkörpern („Ablenkung des Alexins").

a	b = 10	b = 6	b = 4
1	31	—	—
10	45	37	30
30	100	81	71
50	100	87	65
100	100	92	64
200	100	35	15
300	64	24	7

Der Effekt ist sehr deutlich. Das Maximum tritt in den drei Serien bei a = etwa 80, 50 und 30 auf. Diese Beobachtungen scheinen sich mit Bordets Ansicht nicht gut zu vertragen, und ebensowenig mit Ehrlichs. Wenn das katalytische Agens in größerer Menge anwesend ist, müßten wir eine Verstärkung der Wirkung erwarten, aber das Umgekehrte ist der Fall, wenn a größer als 100 ist. Aber auch nach Ehrlichs Ansicht, nach der sich das Hämolysin in dem Gemisch zunächst bildet und dann die Erythrocyten angreift, dürfte die Menge der aktiven Substanz nicht abnehmen, wenn die Konzentration des Immunkörpers steigt, und der Effekt müßte genau derselbe sein, wie nach Bordets Theorie. Ehrlich hat folgende Erklärung angenommen, die von Neißer und Wechsberg für die Versuche gegeben wurde, bei denen sie die Bakterien in Gegenwart von viel Immunkörper unangegriffen fanden: Wenn a groß ist, so ist es gegen die Alexinmenge b im Überschuß vorhanden, und alles Alexin wird als Lysin a b gebunden, bevor die Bakterien beigemischt werden. Die Bakterien binden darauf den Überschuß von a zu der Verbindung e a. Wenn nun die Affinität von b zu a größer ist als zu e a, so wird b als Lysin a b in der Lösung bleiben und nicht an e a gehen, um die Verbindung e a b zu bilden, die Hämolyse ergibt. Es hängt vom Zufall ab, ob die Affinität von b zu a größer als zu e a ist, wie in diesem Falle, oder umgekehrt, in welchem Falle Hämolyse auftreten würde. Diese äußerst gekünstelte Erklärung scheint mir unzutreffend zu sein. Denn wenn wir die Verbindungen e a und a b haben und die Verbindung e a b gebildet werden kann, so hängt ihre Entstehung ganz davon ab, ob e größere Affinität zu a b als zu a hat.[1]) Wenn

[1]) Es wird vorausgesetzt, daß die Menge von a diejenige Menge übersteigt, die nötig ist, um die Mengen e und b zu binden (Lysine damit zu

Digitized by Google

nicht, so bildet sich kein e a b, auch wenn a nicht im Überschuß vorhanden ist. Daher dürfte also in Neißers und Wechsbergs Versuchen keine Bakteriolyse und in den oben angeführten Versuchen keine Hämolyse auftreten, wenn Ehrlichs Idee richtig wäre.

Die wahrscheinliche Ursache ist die folgende: Wenn a sehr groß ist, so ist die Absorption durch die Zellen nicht praktisch vollständig, sondern ein Teil verbleibt in der umgebenden Flüssigkeit, und dieser Teil wächst rasch mit wachsendem a (vgl. S. 97). a bildet mit b eine Verbindung a b sowohl innerhalb wie außerhalb der Zellen. Diese Verbindung ist teilweise dissoziert, so daß ihre Menge zunimmt und die freie Alexinmenge b abnimmt, wenn die in der Flüssigkeit anwesende Menge von a wächst. Bei großem Überschuß an a kann b praktisch vollständig gebunden sein. Das scheint bei Neißer und Wechsbergs Versuchen der Fall gewesen zu sein (die Versuchsfehler sind zu groß, um einen sicheren Schluß zu gestatten). Die Zellmembranen sind praktisch undurchlässig für das Lysin a b (vgl. S. 144), und nur das aus a und b in den Zellen gebildete Lysin ist wirksam. Da nun sehr wenig, praktisch gar kein b in der Lösung frei ist, so kann während der gegebenen Reaktionszeit nicht so viel in die Zellen hineindiffundieren, um Lysis zu erzeugen, während von a das Vielfache der nötigen Menge darin vorhanden ist. Wenn a abnimmt, so nimmt die Menge von b in der umgebenden Flüssigkeit zu, und eine größere Menge diffundiert in einer gegebenen Zeit in die Zellen, während die absorbierte Menge a noch immer für die lytische Wirkung genügt. In dieser Weise kann die in den Zellen vorhandene Menge von a b mit abnehmendem a zunehmen, wenn diese Substanz in großem Überschuß in der umgebenden Flüssigkeit vorhanden ist. Das Auftreten eines Maximums wird so ganz leicht verständlich. Dieses Maximum ist sehr flach, woraus hervorgeht, daß das Hämolysin a b nur in Gegenwart eines großen Überschusses von a oder b beständig ist und daß eine Bindung durch starke Affinitäten mit scharfen Diskontinuitäten, wie sie Ehrlich annimmt, ausgeschlossen ist. Unsere Ansicht führt auch zu dem Schlusse, daß der von Neißer und Wechsberg beobachtete Effekt bei kleinen Werten von b mehr hervortreten muß als bei großen. Die Menge diffundierenden freien Alexins ist nämlich in erster Annäherung proportional b, daher auch die Menge des in der gegebenen Wirkungszeit (zwei Stunden bei 37° und die Sedimentationszeit bei niederer Temperatur, etwa 3°) gebil-

bilden). Diese notwendige Menge a ist ziemlich klein, in meinen Versuchen etwa gleich 2, und auch in Neißer und Wechsbergs Versuchen war diese Bedingung wahrscheinlich erfüllt, längst bevor das Maximum auftrat.

Digitized by Google

deten Hämolysins. Bei größerer Alexinmenge (b = 20 in vorliegendem Falle) transportiert die Diffusion in der gegebenen Zeit auch bei den größten Konzentrationen von a, die vorkamen, genügend Alexin, um totale Hämolyse hervorzurufen. Ferner muß, da die Menge freien Alexins nahezu proportional b und umgekehrt proportional a ist, nahezu dieselbe Wirkung erzielt werden, wenn b : a konstant ist. Das ist nun wirklich der Fall, z. B. gehört der Hämolysegrad 64 zu folgenden Werten von b : a: $\frac{10}{300} = 0{,}033$, $\frac{6}{150} = 0{,}04$, und $\frac{4}{100} = 0{,}04$. Das ist offenbar nur dann richtig, wenn der Hämolysegrad nicht größer ist, als ihn die anwesende Menge von b hervorrufen kann, so daß die angegebene Regel nur eine rohe Annäherung sein kann. Aus dieser Regel folgt auch, daß das Maximum, das zu kleinerem b gehört, auch bei kleinerem a auftreten muß, und in der Tat sind die a-Werte beim Maximum nahezu proportional den b-Werten (80 : 10 = 8, 50 : 6 = 8,3, 30 : 4 = 7,5).

Es ist bei verschiedenen Untersuchungen bemerkt worden, daß die für vollständige Hämolyse notwendige Alexinmenge um so kleiner ist, je größere Mengen von Immunkörper für die „Sensibilisation" der Erythrocyten verwendet werden.[1]) Diese Frage wurde von Morgenroth und Sachs einer genaueren Prüfung unterworfen.[2]) Sie fanden in einem Fall, nämlich der Hämolyse von Schaf-Erythrocyten mittels Immunkörpers aus Ziegenblut und Alexins aus Meerschweinchenserum, die Menge b des Alexins oft nahe umgekehrt proportional der Menge a des angewandten Immunkörpers. In einem anderen Fall, Hämolyse von Erythrocyten aus Ochsenblut mit Immunkörper aus Ziegenserum und Alexin aus Serum von Meerschweinchen, Kaninchen oder Schafen, war die zur vollständigen Hämolyse notwendige Menge Hämolysin nahezu oder vollständig unabhängig von der Menge angewandten Immunkörpers. In anderen Fällen galt dasselbe, ausgenommen, wenn a sehr klein war. Um dieses vollständig verschiedene Verhalten zu erklären, bedienen sich die Verfasser ziemlich komplizierter Hypothesen, auf die hier näher einzugehen zu viel Platz beanspruchen würde. Diese Versuche sind die ersten quantitativen Messungen in größerem Maßstabe über die Wirkung zusammengesetzter Hämolysine und verdienen daher ein gewisses Interesse.

Eine andere Beobachtung quantitativer Art ist von Morgen-

---

[1]) v. Dungern, Münch. med. Wochenschr. 1900, Nr. 20. Gruber, Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 15.

[2]) Morgenroth und Sachs, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 35.

Digitized by Google

roth[1]) gemacht. Er bestimmte die kleinste Menge Alexin, die zur vollständigen Hämolyse genügte, und die größte Menge, die zugesetzt werden konnte, bevor wahrnehmbare Hämolyse auftrat. Immunkörper war dabei im Überschuß zugegen. Bei anderen Versuchen war das Alexin im Überschuß zugegen und die Mengen Immunkörper, die zur vollständigen Hämolyse und für die erste Spur von Hämolyse nötig waren, wurden beobachtet. Morgenroth fand das Verhältnis der beiden genannten Alexinmengen im Mittel von 13 Kombinationen gleich 100 zu 13,6 und das der Immunkörpermengen gleich 100 zu 14,1 (Mittel aus 10 Kombinationen). Wenn die Menge gebildeten Hämolysins nahezu proportional der angewandten Alexin- bzw. Immunkörpermenge ist, was ziemlich wahrscheinlich ist, und die Regel gilt, daß der Hämolysegrad dem Quadrat des wirksamen Hämolysins proportional ist, so geht aus diesen Ergebnissen hervor, daß eine Hämolyse von 2% eben wahrnehmbar ist, was in manchen Fällen ziemlich richtig sein mag.

Ganz vor kurzem hat Wilfred H. Manwaring eine Kurve gegeben, die den Betrag der Hämolyse durch verschiedene Mengen Immunkörper in Gegenwart eines großen Überschusses von Alexin darstellt. Auch hier kann angenommen werden, daß die gebildete Hämolysinmenge proportional der Menge des Immunkörpers ist. Die folgenden Zahlen sind der Originalkurve entnommen, H ist der Grad der Hämolyse, A die Menge des Immunkörpers. Über die Natur der angewandten Präparate sind keine Angaben gemacht.

Hämolyse mittels verschiedener Mengen Immunkörper (Manwaring):

A	H	$\sqrt{H}$	$\sqrt{H}$: A	A	H	$\sqrt{H}$	$\sqrt{H}$: A
1	0,5	0,71	0,71	12	47	6,86	0,57
2	1	1,0	0,5	13	58	7,62	0,59
3	1,5	1,23	0,41	14	68	8,25	0,59
4	2	1,41	0,35	15	79	8,89	0,59
5	2,5	1,58	0,32	16	84	9,17	0,57
6	3	1,73	0,29	17	86	9,27	0,55
7	4	2,0	0,29	18	90	9,49	0,53
8	6	2,45	0,31	19	93	9,64	0,51
9	9	3,0	0,33	20	97	9,85	0,50
10	22	4,69	0,47	21	99	9,95	0,47
11	35	5,92	0,54	22	100	10,0	0,45

Zwischen den Hämolysengraden 35 und 90, d. h. über den größeren Teil des untersuchten Intervalles, besteht eine bemerkenswerte

[1]) Morgenroth, Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 5.
[2]) Manwaring, Journ. Biol. Chemistry, 1, 213 (1906).

Digitized by Google

Proportionalität zwischen der Quadratwurzel aus dem Hämolysegrad und der Menge des Immunkörpers. Bei geringerer Konzentration des Immunkörpers ist die Hämolyse nicht so groß wie diese Regel verlangt, was mit dem Verhalten anderer Lysine übereinstimmt, abgesehen davon, daß die Abweichung von der Regel hier über ein so großes Intervall wie 0 bis 30% sichtbar ist, während bei anderen Lysinen die Abweichungen erst unterhalb 10 oder 15% beginnen.

In ihrer zitierten Arbeit benutzen Morgenroth und Sachs[1]) unter anderen auch die Hypothese, daß Immunkörper und Alexin manchmal in eine Verbindung, Hämolysin oder Hämolysin vereinigt mit einem Erythrocyten, eingehen, die nur in Gegenwart beträchtlicher Mengen der Komponenten beständig ist. Diese verschiedenen Substanzen beteiligen sich nach der Ansicht der Frankfurter Schule an einem Gleichgewicht. Die Anhänger Bordets andererseits, unter denen Metschnikoff, Gruber und Biltz genannt werden können, betrachten die hämolytische Wirkung als eine Adsorptionserscheinung. Es schien nun möglich, zwischen diesen beiden Ansichten eine Entscheidung durch quantitative Versuche herbeizuführen, und Ehrlich lud mich ein, eine Untersuchung über diese Frage im Laboratorium des Serum-Institutes in Frankfurt am Main auszuführen. Diese Untersuchung führte zu dem unzweifelhaften Schlusse, daß die Reaktion zwischen Immunkörper und Alexin von einem chemischen Gleichgewicht beherrscht wird, aber die maßgebende Reaktion vollzieht sich im Innern der Erythrocyten. Es ist sehr wahrscheinlich, daß ein solches Gleichgewicht auch in der Mischung von Immunkörper und Alexin auftritt, worauf die Verminderung der hämolytischen Wirkung mit steigender Immunkörpermenge in manchen Fällen hinweist (vgl. S. 147). Es ist schließlich sehr wahrscheinlich, daß das Hämolysin im Inneren der Erythrocyten mit den Molekülen des Protoplasmas in Verbindung tritt, ebenso wie das Tetanolysin oder die Alkalien (vgl. S. 73), aber über diese Reaktion lehren meine Versuche wenig oder nichts.

Meine Messungen gründeten sich auf die Bestimmung des Hämolysegrades, den eine gegebene Mischung von Alexin und Immunkörper an einer gegebenen Menge Erythrocyten hervorruft. Zu diesem Zwecke wurde jedesmal 1 ccm einer 5prozentigen Erythrocytenemulsion (aus Schaf- oder Ochsenblut) in physiologischer Chlornatriumlösung mit 1,5 ccm einer Flüssigkeit gemischt, die Immunkörper und Alexin in der gewünschten Menge enthielt, und physiologische Salzlösung

[1]) Morgenroth, Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 43. Morgenroth und Sachs, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 35.

Digitized by Google

zugegeben, so daß das Gesamtvolumen stets 2,5 ccm betrug. Alle Präparate wurden in zuvorkommender Weise vom Institut zur Verfügung gestellt.

Die Blutemulsion und die hämolytische Mischung wurden zunächst jede für sich durchgeschüttelt, darauf wurde die Blutemulsion in raschem Strahle in die Mischung gegossen — die Gründe dafür sind oben angeführt (vgl. S. 10) —. Dann wurden die Reagenzröhrchen, die die Mischung enthielten, zwei Stunden lang in einen Heißluftschrank von 37° gestellt, nach welcher Zeit sie herausgenommen und bis zum folgenden Morgen (etwa 17 Stunden) in einem Eisschrank von etwa 2° aufbewahrt wurden. Dann wurden sie geprüft, indem sie mit Probierröhrchen verglichen wurden, die verschiedene Mengen der betreffenden Erythrocytenart, mit destilliertem Wasser lysiert, enthielten: so wurde der Hämolysegrad bestimmt.

Der Immunkörper und das Alexin wurden bei Zimmertemperatur (20—24°) gemischt und standen etwa eine halbe Stunde, bevor die Blutemulsion zugesetzt wurde, aber die Dauer der Reaktion zwischen diesen zwei Stoffen schien keinen merklichen Einfluß zu haben, wie auch besondere Versuche zeigten. Wie wir später sehen werden, geht der chemische Prozeß wahrscheinlich im Innern des roten Blutkörperchens vor sich, mindestens in der Hauptsache, und es ist also leicht zu verstehen, daß die Dauer der Reaktion zwischen Immunkörper und Alexin vor der Beimischung des Blutes ohne oder von geringem Einfluß ist.

Wenn wir die hämolysierte Menge kennen, können wir die Menge des Hämolysins berechnen. Dazu machen wir Gebrauch von der Regel, daß die hämolysierte Menge nahezu proportional dem Quadrate der wirksamen Hämolysinmenge ist. Daß diese Regel bei kleinen Hämolysin-Konzentrationen nicht exakt gilt, schadet nicht viel, denn die Hauptsache ist, die Bedingungen zu finden, unter denen man gleiche Mengen Hämolysin erhält, und das ist offenbar der Fall, wenn die Hämolyse gleich stark ist. Wir benutzen die Regel eigentlich nur um die Beobachtungen einfach darzustellen.

Als Beispiel gebe ich eine Reihe Versuche mit roten Blutkörperchen aus einem Ochsen. Der Immunkörper wurde dargestellt, indem solche Blutkörperchen in die Venen einer Ziege eingespritzt wurden. Das Alexin war normales Serum aus Meerschweinchen. Als willkürliche Einheit dienten je 0,001 ccm der Präparate, die Immunkörper und Meerschweinchenserum enthielten. Die Einheit des Hämolysins ist der hundertste Teil der Menge, die zur totalen Hämolyse der anwesenden Blutkörperchen nötig ist.

Digitized by Google

Die erste der folgenden Tabellen gibt die beobachtete hämolysierte Menge, die zweite die Hämolysinmenge (Quadratwurzel der vorhergehenden mal 100). In Klammern sind die Werte verzeichnet, die nach der Formel berechnet sind:

$$(5a - x)\ (20b - x) = 90x,$$

worin a die zugesetzte Menge von Immunkörper und b von Alexin bedeutet. x ist die Menge gebildeten Hämolysins.

Gleichgewicht zwischen Immunkörper (Ziege), Alexin (Meerschweinchen) und Hämolysin (gegen Ochsen-Erythrocyten).

a) Hämolyse.

a =	10	30	100	300	900
b = 60	16 (21)	— —	— —	— —	— —
40	14 (20)	— —	— —	— —	— —
25	14 (18)	— —	— —	— —	— —
15	15 (14)	— —	— —	— —	— —
10	14 (10)	50 (70)	96 (100)	100 (100)	— —
6	5 (6)	35 (36)	72 (96)	96 (100)	— —
4	4 (4)	20 (19)	56 (43)	67 (53)	— —
2,5	— —	6 (8)	26 (18)	22 (22)	— —
1,5	— —	2 (3)	6 (6)	5 (8)	6 (9)
1	— —	— —	2 (3)	2 (3)	3 (4)
0,6	— —	— —	1 (1)	2 (1)	2 (1)

b) Menge des Hämolysins.

a =	10	30	100	300	900
b = 60	40 (46)	— —	— —	— —	— —
40	37 (45)	— —	— —	— —	— —
25	38 (42)	— —	— —	— —	— —
15	39 (37)	— —	— —	— —	— —
10	38 (33)	71 (84)	98 (100)	100 (100)	— —
6	22 (25)	59 (60)	85 (98)	98 (100)	— —
4	20 (20)	45 (44)	75 (66)	82 (73)	— —
2,5	— —	24 (29)	51 (43)	47 (47)	— —
1,5	— —	15 (18)	25 (25)	22 (28)	24 (29)
1	— —	— —	15 (17)	15 (19)	18 (20)
0,6	— —	— —	11 (10)	13 (11)	13 (12)

Wie diese Zahlen zeigen, ist die Übereinstimmung zwischen Versuch und Rechnung sehr befriedigend und die Unterschiede liegen innerhalb der möglichen Beobachtungsfehler. Die niedrigsten beobachteten Werte liegen im allgemeinen unter den berechneten, was auf der Inexaktheit der Quadratwurzel-Regel beruhen mag. Die Reaktionszeit war lang genug, um nahezu den Grenzwert der Reaktion zu ergeben, so daß es überflüssig war, die Zeit genau zu messen.

Digitized by Google

Wenn nun der Immunkörper wie ein katalytisches Agenz wirkte, mußte man erwarten, daß die Hämolyse bei konstanter Menge des Immunkörpers mit der Alexinmenge wachsen sollte. Das ist auch der Fall, solange die Menge des Immunkörpers sehr klein ist. Aber wenn die Menge des Alexins zu totaler Hämolyse hinreicht ($b > 5$), so sollte die Reaktion sich bei kleinen Konzentrationen des Immunkörpers langsam der totalen Hämolyse nähern, und bei großen schnell. Auch bei kleinen Immunkörpermengen dürfte das Ende der Reaktion nicht eher eintreten, als bis totale Hämolyse erreicht ist, sobald nur $b > 5$. Die Erfahrung zeigt ganz das Gegenteil. Bei kleinen Mengen Immunkörper erweist sich die Hämolyse nahezu unabhängig von der zugesetzten Alexinmenge, sobald diese einen bestimmten Wert überschreitet ($b > 10$). Das kann nur erklärt werden durch eine chemische Reaktion, bei der der Immunkörper Material zu dem gebildeten Hämolysin beiträgt. Bei geringen Mengen von Immunkörper kann keine größere Menge Hämolysin gebildet werden, als der zugänglichen Menge Immunkörper äquivalent ist, die zugesetzte Alexinmenge mag noch so groß sein. Hiermit steht die Beobachtung in Einklang und dieselbe Überlegung gilt offenbar für das Alexin. Wenn es in geringer Menge zugesetzt wird, so kann nicht mehr als die äquivalente Menge Hämolysin gebildet werden. Diese Eigentümlichkeit zeigt sich auch sehr deutlich in den Messungen.

Viel besser als alle allgemeinen Überlegungen zeigt die Übereinstimmung zwischen den aus der Formel berechneten und den beobachteten Werten die Richtigkeit der gefaßten Meinung. Diese Formel zeigt auch, daß eine Einheit Hämolysin (d. i. der hundertste Teil der Menge, die zur totalen Hämolyse eines ccm 5prozentiger Emulsion von roten Ochsenblutkörperchen nötig ist) dem fünften Teil von einer Einheit des Immunkörpers und dem zwanzigsten Teil von einer Alexineinheit äquivalent ist. Daraus, daß die Hämolysinmenge von der Immunkörper- und Alexinmenge, alles umgerechnet in Äquivalente, abgezogen werden muß, geht hervor, daß diese beiden Stoffe bei der Bildung des Hämolysins verbraucht werden. Weiter zeigt die Form der Gleichung, daß ein Molekül Immunkörper und ein Molekül Alexin ein Molekül Hämolysin geben.

Ein andres Beispiel ist der Angriff auf rote Schafblutkörperchen, ausgeübt durch ein Hämolysin, das sich aus dem Immunkörper einer mit Schafblut geimpften Ziege und Meerschweinchenserum als Alexin bildete. Die Hämolysinmenge x wurde nach der Formel berechnet:

$$(40\,a - x)\,(25\,b - x) = 1900\,x.$$

Digitized by Google

Ich gebe nur die Reihen der beobachteten Hämolyse:

Hämolyse von Schaferythrocyten durch Immunkörper (Ziege) und Alexin (Meerschweinchen)

a =	1	3	10	30	100	300	1000
b = 60	5(4)	— —	— —	— —	— —	— —	— —
40	5(2)	17(16)	— —	— —	— —	— —	— —
25	2(2)	15(9)	60(75)	— —	— —	— —	— —
15	— —	5(4)	35(33)	95(100)	— —	— —	— —
10	1(0,3)	3(2)	20(16)	80(85)	95(100)	— —	— —
6	— —	2(1)	7(6)	35(31)	75(100)	100(100)	100(100)
4	— —	— —	3(3)	15(15)	35(44)	80(75)	70(90)
2,5	— —	— —	— —	7(6)	15(17)	30(30)	50(36)
1,5	— —	— —	— —	— —	4(6)	4(10)	17(13)
1	— —	— —	— —	— —	— —	2(4)	3(6)

Die Übereinstimmung zwischen beobachteten und berechneten Werten ist so gut wie man nur wünschen kann, wenn man die möglichen Versuchsfehler bedenkt. Es mag vielleicht sonderbar erscheinen, daß keine größeren Mengen Alexin benutzt worden sind, aber das normale Serum von Meerschweinchen enthält an und für sich etwas Hämolysin, so daß eine Korrektion dafür angebracht werden muß — sie bestand in einfacher Subtraktion. Für größere Alexinkonzentrationen würden die Korrektionen ziemlich groß werden, und da ihnen immer eine gewiße Unsicherheit anhaftet, scheint es nicht angebracht, solche Konzentrationen zu benutzen.

Auch hier sagt die Formel, daß sich aus einem Molekül Immunkörper und einem Molekül Alexin ein Molekül Hämolysin aufbaut. Das ist nicht immer der Fall, wie die folgenden Beispiele zeigen. Der Indikator, der benutzt wurde, waren rote Ochsenblutkörperchen; der Immunkörper wurde aus dem Blut eines Kaninchens bereitet, das eine Einspritzung von Ochsenblutkörperchen erhalten hatte und das Alexin war normales Meerschweinchenserum. Die Anordnung der Versuchsreihen war nahezu dieselbe, wie bei den oben erläuterten Beispielen. Die Zahlen bedeuten die Grade der Hämolyse.

Hämolyse von Ochsenerythrocyten durch Immunkörper (Kaninchen) und Alexin (Meerschweinchen).

a =	0,4	1	10	50	100	300
b = 60	12(11)	32(35)	— —	— —	— —	— —
40	12(10)	27(26)	100(100)	— —	— —	— —
25	5(7)	18(17)	70(83)	— —	— —	— —
15	3(5)	6(11)	40(44)	— —	90(100)	— —
10	— —	5(7)	27(27)	— —	70(59)	— —
6	— —	2(4)	12(13)	40(22)	22(26)	— —
4	— —	1(3)	4(7)	10(10)	3(12)	10(14)
2,5	— —	— —	2(3)	3(5)	2(5)	5(6)

Digitized by Google

Die Gleichung, die der Rechnung zugrunde liegt, hat die Form:

$$(100\,a - x)^{2/3}\,(10\,b - x) = 1{,}8\,x^2$$

Hier treffen wir den Exponenten $^2/_3$, der in diesem Gebiet nicht selten zu sein scheint. Die Gleichung sagt, daß 2 Moleküle Immunkörper mit 3 Molekülen Alexin 6 Moleküle Hämolysin geben.

Hier überall werden Immunkörper und Alexin bei der Bildung des Hämolysins nachweisbar verbraucht. Deshalb wird in der Formel immer x von der äquivalenten Menge Immunkörper und Alexin abgezogen. In einem andren ähnlichen Fall, nämlich bei der Bildung der hämolytischen Substanz Cobralecithid aus Cobragift und Lecithin, scheint die Hämolysinmenge immer so klein zu sein, daß es keinen Einfluß hat, ob es von den äquivalenten Mengen Cobragift und Lecithin abgezogen wird oder nicht. Die Versuche wurden mit einer 0,1 prozentigen Lösung von Cobragift (1 ccm gesetzt gleich 10000 Einheiten) und einer 1prozentigen Lösung von Lecithin (1 ccm gesetzt gleich 1000 Einheiten) ausgeführt. Die Anordnung der Tabelle ist gleich der vorhergehenden:

Hämolyse von Ochsenerythrocyten durch Cobralecithid.

Lecithin	2	3	10	30	100
Cobra = 250	88 (94)	— —	— —	— —	— —
150	80 (57)	100 (100)	— —	— —	— —
100	32 (37)	72 (79)	— —	— —	— —
75	32 (28)	64 (59)	— —	— —	— —
50	20 (20)	36 (39)	100 (100)	— —	— —
35	10 (13)	32 (28)	88 (87)	— —	— —
25	8 (9)	32 (20)	66 (62)	100 (100)	— —
15	— —	8 (12)	36 (38)	72 (84)	— —
10	— —	4 (8)	— —	60 (56)	100 (100)
7,5	— —	— —	— —	40 (42)	68 (96)
5	— —	— —	— —	36 (28)	64 (64)
3,5	— —	— —	— —	4 (20)	40 (45)
2,5	— —	— —	— —	— —	40 (32)
1,5	— —	— —	— —	— —	32 (19)
1	— —	— —	— —	— —	24 (13)

Die berechneten Werte wurden mit Hilfe der Formel gewonnen:

$$K \cdot (L - 1{,}5)^{2/3} = 6{,}67\,x^2 = 6{,}67\,h,$$

wo K die Menge des zugesetzten Cobragiftes darstellt, L die entsprechende Menge Lecithin, x die Menge gebildeten Hämolysins und h die beobachtete Stärke der Hämolyse, wie sie die obige Tabelle angibt. Aus der Formel sieht man, daß keine Hämolyse auftritt, bis 1,5 Einheiten Lecithin zugesetzt sind. Diese Zahl wurde durch be-

Digitized by Google

sondere Versuche festgestellt. Die Versuche mit Cobralysin zeigen, daß sich dieses Gift etwas anders als die andren Hämolysine verhält. Sonst wird ein Grenzwert der Wirkung erreicht, wenn die Mischung zwei Stunden im Brutschrank und darauf 17 Stunden im Eisschrank steht. Aber beim Cobralysin ging die Hämolyse in den abgesetzten Blutkörperchen weiter und war nach weiteren 24 Stunden vollständig verschoben, obwohl die Temperatur während des größten Teils dieser Zeit nur 2° betragen hatte. Das Hämoglobin, das in den letzten 24 Stunden ausgetreten war, hatte keine Zeit gehabt, durch die ganze Flüssigkeit zu diffundieren, sondern war in den untersten stark gefärbten Schichten zurückgeblieben. Diese Beobachtungen machen sehr den Eindruck, als ob die hämolytische Substanz in den Erythrocyten absorbiert gewesen wäre.

Die 1,5 Einheiten Lecithin müssen irgendwie durch einen Fremdkörper in der Blutemulsion gebunden worden sein, so daß sie mit dem Cobragift nicht reagierten.

Hier können wir aus der Formel nicht sehen, daß Cobragift und Lecithin bei der Bildung von Cobralecithid verbraucht werden. Dieses muß daher in Lösung äußerst stark dissoziert sein und die geringsten Mengen davon müssen genügen, um die hämolytischen Wirkungen hervorzurufen. Aber es hat auch grade hier Kyes[1]) wahrscheinlich gemacht, daß sich eine Verbindung — das Cobralecithid — vielleicht unter Abspaltung von fetter Säure aus dem Lecithin bildet, die schon in sehr geringer Menge Hämolyse erzeugt.

Die Potenz $^2/_3$ in der letzten Formel ist dieselbe, die bisweilen für den Immunkörper gefunden ist, aber nie für das Alexin. Daraus scheint hervorzugehen, daß das Lecithin bei der Bildung des Hämolysins dieselbe Rolle wie der Immunkörper spielt, während das Cobragift dem Alexin entspricht. Diese Ansicht erhält dadurch eine Stütze, daß das Alexin für die eigentlich giftige Substanz von den zweien gilt, und ebenso natürlich scheint es, daß eher das Cobragift der Träger der giftigen Eigenschaften ist, als daß das unschuldige Lecithin hämolytisch wirkt.

In jüngster Zeit hat man darüber gestritten, ob vielleicht das Lecithin bei der Wirkung eines sehr einfachen hämolytischen Mittels, nämlich des Quecksilberchlorid, beteiligt ist.[2]) Da der Vorgang verhältnismäßig übersichtlich ist, möge er kurz Erwähnung finden. Queck-

[1]) Preston Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 42 und 43.

[2]) Siehe: Detre und Sellei, Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 30. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 45 u. 46; 1905, Nr. 30. Sachs, Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 35.

Digitized by Google

silberchlorid wirkt in geringer Menge hämolytisch, wenn es in größerer Konzentration verwendet wird, tritt nicht Hämolyse, wohl aber Agglutination ein. Man beobachtet also hier ein Maximum der hämolytischen Wirkung. Das Ausbleiben der Hämolyse bei höheren Konzentrationen wird auf eine Härtung des Zellprotoplasmas und wohl hauptsächlich der Zellwand zurückgeführt, welche das Austreten des Hämoglobins verhindert. Sachs[1]) vermochte auch durch nachträgliche Zufuhr von Substanzen, wie Jodkalium, Natriumhyposulfit und Eiweißlösungen, die den Eiweißstoffen der Blutkörperchen einen Teil des Sublimats entreißen, Hämolyse zustande zu bringen.

Das Maximum der Wirkung beruht also in diesem Falle darauf, daß das Sublimat einen doppelten Einfluß ausübt, einen zellentötenden, welcher Hämolyse hervorbringt, und einen membranhärtenden, welcher den Austritt des Hämoglobins verhindert. Man kann sich wohl vorstellen, daß in ähnlichen Fällen, wo Maxima beobachtet werden, z. B. bei der hämolytischen Wirkung von Saponin gemischt mit Cholesterin oder beim Botulismusgift, ein ähnlicher doppelter Einfluß vorhanden ist.[2])

Detre und Sellei hatten nun behauptet, daß Lecithin die hämolytische Wirkung von Sublimat herabsetzt. Demgegenüber konnte aber Sachs feststellen, daß ein Zusatz von Lecithin die Wirkung des Sublimats beschleunigt. Sachs hält es mit Recht für wahrscheinlich, daß keine giftige Verbindung von Quecksilberchlorid und Lecithin hier auftritt, sondern „daß es sich vielmehr um einen die blutzerstörende Wirkung des Sublimats irgendwie erleichternden Einfluß des Lecithins handelt". Sachs stellt sich hier also vollkommen auf den Boden der Bordetschen Sensibilisatortheorie. Man kann sich den Mechanismus wohl so vorstellen, daß Lecithin in die Blutkörperchen und speziell ihre Zellenwand hineindringt, wodurch sie für das Hämoglobin (oder das Quecksilbersalz) durchläßlicher wird, und also der Austritt vom Hämoglobin beschleunigt wird.

Demnach erscheint es ganz plausibel, eine ähnliche Wirkung des Lecithins beim Cobragift anzunehmen, speziell da in diesem Fall, wie oben erwähnt, die Wirkung äußerst langsam erfolgt. Wenn der Hauptteil des Lecithins in der umgebenden Flüssigkeit bleibt, so ist die von den Blutkörperchen aufgenommene Lecithinmenge, wenn das Lecithin sich wie ein Agglutinin oder Immunkörper verhält, nahezu proportional der $^2/_3$ Potenz der Lecithinmenge, vermindert um den

[1]) Sachs, Münchner med. Wochenschr. 1902, Nr. 5.

[2]) Madsen, Oversigt over d. kgl. danske Vidensk. Selskabs Forhandlinger 1905, Nr. 1.

Digitized by Google

gebundenen Teil. Um das gefundene Resultat nach der Bordetschen Ansicht zu erklären, müßte man annehmen, daß die Hämolyse proportional der vorhandenen Cobragiftmenge geschieht, und weiter, daß die Permeabilität der Membran der Blutkörperchen der aufgenommenen Lecithinmenge proportional ist. Eine nähere Untersuchung würde zeigen, ob die Bordetsche Ansicht auf diesen Fall wie auf die Hämolyse durch Quecksilberchlorid anwendbar ist.

Wie wir gesehen haben (vgl. S. 97) wird der Immunkörper von Kaninchen bei der Behandlung mit Ochsen-Erythrocyten und der Immunkörper von Ziegen bei der Behandlung mit Schaferythrocyten in schwachen Lösungen vollständig von den roten Blutkörperchen absorbiert. Dasselbe gilt wahrscheinlich von Immunkörper aus der Ziege, behandelt mit Ochsen-Erythrocyten. Da die Blutkörperchen den Immunkörper absorbieren, ehe eine Reaktion stattfindet, muß die Bildung des Hämolysins in ihrem Innern stattfinden. Sie absorbieren sehr wenig Alexin, aber wenn dieses sich mit dem Immunkörper verbunden hat, dringt neues nach und die Bildung des giftigen Hämolysins geht weiter. Daraus, daß das Alexin immer in der ersten Potenz vorkommt, möchte man schließen, daß es in den Blutkörperchen dasselbe Molekulargewicht wie in der umgebenden Flüssigkeit hat, so daß ein konstanter, wahrscheinlich sehr kleiner Bruchteil in den Blutkörperchen zurückgehalten wird. Eigentlich müßte dieser Bruchteil in die Reaktionsgleichung eingeführt werden, aber wenn wir statt dessen, wie oben geschehen, die ganze Alexinmenge einführen, so ändert sich weiter nichts als die Gleichgewichtskonstante. Das entstandene Hämolysin bleibt wahrscheinlich zum größten Teil in den roten Blutkörperchen zurück.

Das Lecithin dringt wahrscheinlich sehr leicht in die roten Blutkörperchen ein und spielt daher die Rolle eines Immunkörpers.

Die Wirkung der zusammengesetzten Hämolysine ist daher wie die der einfachen Hämolysine daran gebunden, daß sie in den roten Blutkörperchen zugegen sind, wodurch diese eine Veränderung erleiden, die ihre Membranen durchlässig für das Hämoglobin macht.

Wie wir gesehen haben, wird der Immunkörper bei höherer Konzentration nicht praktisch vollständig in den Erythrocyten absorbiert, sondern bildet auch außerhalb derselben eine Verbindung mit dem Alexin. Dadurch erklärt sich die scheinbare Anomalie, daß eine größere Menge Immunkörper einen geringeren Hämolysegrad hervorruft (vgl. S. 147). Es ist ohne weiteres klar, daß Gleichungen wie die oben gegebenen eine solche Erscheinung nicht darzustellen vermögen. Dieselbe Ursache mag, wenn auch in schwächerem Grade, auch die

Digitized by Google

Wirkung des Immunkörpers vermindern. Es wäre daher denkbar, daß der Exponent $^2/_3$, der dem Immunkörper zugehört, auf diese Störung zurückgeht, und daß eigentlich die erste Potenz eingesetzt werden müßte, wenn dieser Einfluß nicht in den Experimenten mitspielte. Diese Ansicht scheint dadurch bestätigt zu werden, daß sich der Exponent $^2/_3$ gerade bei der Kombination: Immunkörper von Kaninchen — Ochsenerythrocyten — Alexin von Meerschweinchen — findet, die in einer anderen Versuchsreihe (mit anderen Präparaten) einen sehr ausgesprochenen Effekt, sogenannte Ablenkung des Alexins, gab. Aber diese Erklärung ist auf das Verhalten des Lecithin bei der Bildung des Cobralecithids nicht anwendbar.

Meine Versuche zeigen, daß auch hier eine bemerkenswerte Regelmäßigkeit die Bindung des Immunkörpers und Alexins beherrscht. Daher hatte ich nicht nötig, eine ganze Anzahl verschiedener Erklärungsarten herbeizuziehen, wie es Morgenroth und Sachs taten. Um die Resultate ihrer Messungen zu erklären, nehmen sie an, daß der Immunkörper in verschiedener Art an die Erythrocyten gebunden wird, daß die Affinität zwischen Immunkörper und Alexin in verschiedenem Grade durch den Einfluß der Erythrocyten geändert wird und daß die immunisierten Seren eine große Menge verschiedener Immunkörper enthalten. „Wir bemerken, daß die verschiedenen Erscheinungen, die, wie wir gefunden haben, die relativen Mengenverhältnisse der Immunkörper und Alexine bedingen (bei vollständiger Hämolyse), sehr verschiedene Ursachen haben mögen, aber daß sie sich ohne Einschränkung erklären lassen, wenn wir die drei oben besprochenen Faktoren in Betracht ziehen.“[1]) Dagegen habe ich gefunden, daß die beobachteten Erscheinungen sich mit Hilfe der einzigen Annahme erklären lassen, daß das Massenwirkungsgesetz die Reaktion zwischen Immunkörper und Alexin beherrscht, und habe keine besonderen Hypothesen für die einzelnen Fälle zu machen brauchen. Es kann wohl auch als sehr wahrscheinlich angesehen werden, daß eine genauere Betrachtung der von Morgenroth und Sachs behandelten Kombination zu einer einfacheren Erklärung geführt hätte, als die ist, die sie vorschlagen.

Wir haben oben die passive Immunisierung besprochen: Das Antitoxin, das sich durch wiederholte Einspritzungen eines Giftes, z. B. Ricin, in dem Serum eines Tieres, z. B. eines Kaninchens, gebildet hat, wird in die Venen eines anderen Tieres, z. B. eines Meerschweinchens, eingespritzt. Das Antiricin ist dann in dem Blutserum

[1]) Morgenroth und Sachs, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 35.

Digitized by Google

des passiv immunisierten Meerschweinchens enthalten, wo es langsam zerfällt (vgl. S. 3). Andererseits erzeugt das Tier einen Antikörper gegen das Antiricin, wie sich durch Versuche mit Mischungen von Ricin, Antiricin und Anti-Antiricin zeigen läßt. Solche Versuche sind von Bashford[1]) ausgeführt worden, der angibt, daß einige Versuche analoge Eigenschaften von Blut erkennen lassen, das aus Tieren stammt, die mit Diphtherieserum oder Antitetanolysin geimpft sind. Die Versuche gelingen nicht, wenn das passiv immunisierte Tier derselben Art angehört wie dasjenige, das das Antitoxin erzeugt hatte.

Wahrscheinlich bindet der neue Antikörper das Antiricin ebenso wie Ricin, so daß das Antiricin sich zwischen dem Ricin und dem Antikörper verteilt, und das Ricin wirkt daher so, als ob seine Menge größer als die wirklich angewandte wäre.

In ähnlicher Weise gelingt es, durch intravenöse Injektion eines Hämolysins (d. h. einer antierythrocytischen Substanz) Antikörper zu erzeugen. Z. B. immunisiert man ein Kaninchen aktiv gegen Ochsenerythrocyten und spritzt den in seinem Serum erzeugten Immunkörper in die Venen eines Meerschweinchens: das Serum dieses Tieres enthält dann einen gegen den injizierten Immunkörper spezifischen Antiimmunkörper. Solche Versuche sind zuerst von Bordet[2]) ausgeführt, der die neuen Körper „Antisensibilisator“ und „Antialexin“ nannte. Fast gleichzeitig stellten Ehrlich und Morgenroth[3]) solche Körper dar, die sie „Antiimmunkörper“ (später „Antiamboceptoren“) und „Antikomplemente“ nannten. Pfeiffer und Friedberger[4]) stellten Antiimmunkörper gegen das Choleraserum einer Ziege dar, indem sie dieses Serum in die Venen eines Kaninchens spritzten.

Nun enthält ein zusammengesetztes Hämolysin sowohl Immunkörper wie Alexin, wie auch Hämolysin: es erscheint daher nicht unmöglich, Antikörper gegen diese drei verschiedenen Stoffe zu erhalten. Um zu entscheiden, ob der Antikörper Antiimmunkörper oder Antialexin ist, verfuhren Ehrlich und Morgenroth so, daß sie ihn mit Immunkörper mischten. Wenn er ein Antialexin war, mußte der Immunkörper frei bleiben und sich durch Erythrocyten ausschütteln lassen, die dann bei Behandlung mit Alexin Hämolyse zeigen mußten. Wenn es sich aber um einen Anti-Immunkörper handelt,

---

[1]) Bashford, Journal of pathologie and bacteriology, 9, 192 (1903).

[2]) Bordet, Annales de l'institut Pasteur 14, 270 (1900).

[3]) Ehrlich und Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr. 1900, Nr. 31 und 1901, Nr. 21 und 22.

[4]) Pfeiffer und Friedberger, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 1.

Digitized by Google

so bindet er den Immunkörper, und die Erythrocyten können nichts aufnehmen.

Das Antihämolysin, wenn solch ein Antikörper existiert, geht offenbar mit dem Antialexin. Hier ist die Spezifität nicht sehr ausgeprägt. Auch normales Serum enthält Antiimmunkörper und Antialexine und erzeugt, in die Venen von Tieren eingespritzt, dort Antialexine. Nach Ehrlich und Morgenroth erzeugt ein durch Erhitzung auf 56° inaktiviertes Serum, das also kein Alexin enthalten sollte, doch Antialexin. (Die Antialexine vertragen eine Temperatur von 55—60°, man erhitzt sie im allgemeinen vor der Verwendung, um Störungen, die von anwesendem Alexin herrühren, zu vermeiden.) Eine andere von Ehrlich und Morgenroth gefundene merkwürdige Tatsache ist die, daß das Serum einer Ziege, die Einspritzungen von Kaninchenserum erhalten hat, Antialexin nicht nur gegen Kaninchenserum, sondern auch gegen das Alexin des Meerschweinchenserums enthält. Dasselbe Antialexin ist auch in dem Serum einer mit Pferdeserum behandelten Ziege vorhanden.

Die Antialexine sind als besonders wichtig angesehen worden, weil sie die Alexine binden, die nach Bordets sowohl wie Ehrlichs Ansicht der wirksame Bestandteil der Hämolysine sind. Daher ist der größte Teil der Arbeit, die den antihämolytischen Substanzen gewidmet worden ist, auf die Erforschung der Antialexine verwandt worden. Sie wurden im allgemeinen einfach durch Injektion des normalen Serums eines Tieres in die Venen eines anderen Tieres dargestellt. Wie die nachfolgende Erörterung dieser Versuche zeigen wird, enthalten die so bereiteten Seren anscheinend sowohl Antiimmunkörper wie Antialexine.[1]) Wenn man die Wahrscheinlichkeit der Erzeugung dieser zwei Antikörper miteinander vergleicht, so muß man bedenken, daß die Immunkörper in viel geringerer Menge als die Alexine vorkommen und der Organismus daher die nötige Menge Antiimmunkörper leichter erzeugen wird als das nötige Antialexin. Überdies enthält das Blut des Tieres selbst, das Gefahren hämolytischer Natur ausgesetzt ist, gewöhnlich ein Alexin, das in Verbindung mit dem geeigneten Immunkörper die Erythrocyten hämolysiert. Gegen dieses Alexin erzeugt das Tier offenbar keinen Antikörper, denn sonst könnte das Alexin keine Schutzwirkung gegen fremde, in das Blut eindringende Körper ausüben.

Morgenroth und Sachs[2]) ließen Antialexin auf eine Mischung von Immunkörper und Alexin wirken, die eben hinreichte, um die

[1]) Wie Bordet angegeben hat (l. c. S. 273).

[2]) Morgenroth und Sachs, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 35.

Digitized by Google

angewandte Erythrocytenmenge vollständig zu hämolysieren, und ermittelten die Antialexinmenge, die nötig war, um die Wirkung vollständig zu unterdrücken. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle enthalten, in der a die Menge des Immunkörpers bezeichnet (ausgedrückt in ccm des angewandten Präparates), b die Alexinmenge und c die Antialexinmenge, die den Prozeß zum Stillstand bringt. Die Erythrocyten waren in einer Menge von 1 ccm einer 5prozentigen Emulsion anwesend. Das Alexin und Antialexin waren 30 Minuten bei 37° miteinander in Berührung, bevor die Erythrocyten und der Immunkörper zugesetzt wurden.

Versuche von Morgenroth und Sachs über die relativen Mengen von Antialexin.

1. Schaferythrocyten:

Immunkörper aus einer mit Schaferythrocyten behandelten Ziege;
Alexin: normales Meerschweinchenserum;
Antialexin: Immunserum aus einer mit Kaninchenserum behandelten Ziege.

a	b	c	c:b	c:a
0,3	0,006	0,35	58	1,2
0,05	0,006	0,1	17	2
0,01	0,01	0,075	7,5	7,5
0,005	0,05	0,015	0,3	10

2. Wie 1, das Antialexin aber aus einem mit Meerschweinchenserum behandelten Kaninchen:

a	b	c	c:b	c:a
0,2	0,0035	0,005	1,4	0,025
0,1	0,025	0,04	1,6	0,4

3. Ochsenerythrocyten:

Immunkörper aus einem mit Ochsenerythrocyten behandelten Kaninchen;
Alexin: normales Meerschweinchenserum;
Antialexin: aus einer mit Kaninchenserum behandelten Ziege.

a	b	c	c:b	c:a
0,2	0,05	0,75	15	3,8
0,004	0,1	0,1	1,0	25

4. Erythrocyten aus menschlichem Blut:

Immunkörper aus einem mit menschlichen Erythrocyten behandelten Kaninchen:
Alexin: normales Kaninchenserum;
Antialexin aus einer mit Kaninchenserum behandelten Ziege.

a	b	c	c:b	c:a
0,2	0,05	0,075	1,5	0,38
0,1	0,05	0,035	0,7	0,35
0,05	0,1	0,025	0,25	0,5

Digitized by Google

Nur in Fall 2 besteht annähernd eine Proportionalität zwischen c und b, wie sie die Verfasser erwartet hatten. Offenbar muß, wenn das Alexin ohne Dissoziation von dem Antialexin gebunden wird, die zur Neutralisation erforderliche Menge Antialexin der angewandten Alexinmenge proportional sein, so wie es eben diese Versuchsreihe zeigt. Die Verfasser machen auf die bemerkenswerte Tatsache aufmerksam, daß hier das Antialexin durch Injektion des angewandten Alexins erzeugt war, was bei den übrigen Versuchsreihen nicht der Fall war. Es erscheint wohl möglich, daß diese Methode die einzige ist, die ein spezifisches Antialexin mit starker Affinität zum Alexin zu liefern vermag.

Wenn die Affinität nicht sehr groß ist und die Reaktion zwischen Alexin und Antialexin infolgedessen unvollständig bleibt, können wir keine Proportionalität zwischen der neutralisierenden Antialexinmenge und der anwesenden Alexinmenge erwarten. Es sei daran erinnert, daß hier nicht von einer absoluten Neutralisation die Rede ist, bei der die Alexinmenge auf 0 sänke, sondern nur von einer Reduktion der Alexinmenge auf etwa 14% ihres ursprünglichen Wertes (vgl. Morgenrots Untersuchungen S. 750).

Auf wie komplizierte Verhältnisse man in diesem Gebiete gefaßt sein muß, geht aus dem folgenden fingierten Beispiel hervor, wo vorausgesetzt wird, daß die Gleichgewichtsgleichung die Form hat:

$$(5a - x)\,(20b - x) = 100x.$$

Diese Gleichung entspricht ziemlich genau dem Verhalten der Kombination: Immunkörper aus mit Stiererythrocyten behandelter Ziege und Meerschweinchenserum als Alexin. Ich nehme an, daß das Alexin dieselbe Affinität zum zugesetzten Antialexin wie zum Immunkörper hat, und daher beide Gleichgewichte durch dieselbe Formel dargestellt werden können. Daraus folgt, daß sich das an den Immunkörper gebundene zu dem an das Antialexin gebundenen Alexin verhält, wie die Menge des Immunkörpers zu der Menge des Antialexins. Die folgende Tabelle entspricht vollkommen denen von Morgenroth und Sachs. b ist die Alexinmenge, die in Gegenwart der Menge a des Immunkörpers zu vollständiger Hämolyse nötig ist, c ist die Menge Antialexin, die die Hämolysinmenge auf den achten Teil der zu vollständiger Hämolyse notwendigen herabsetzt, was nahezu dem Grenzwert der wahrnehmbaren Hämolyse entspricht.

Hier bemerken wir, daß bei einer bestimmten Menge Immunkörper ($a = 40$, $b = 10$), wenn Immunkörper und Alexin in äquivalenten Mengen anwesend sind, c durch ein Minimum geht. Bei

Digitized by Google

höheren Werten von a wächst c mit a und strebt der Proportionalität mit a zu, wenn dieses sehr hohe Werte erreicht. Bei niedrigeren Werten von a wächst c mit b. Mit anderen Worten: der Zusatz einer gegebenen Menge Antialexin hat eine maximale Wirkung, wenn a = 40, während für Werte über oder unter 40 die hämolytische Wirkung weniger geschwächt wird. Das allgemeine Verhalten wird sich gleich bleiben, auch wenn die Affinität des Immunkörpers zu dem Alexin nicht gleich der des Antialexins ist, doch verschiebt sich dann das Minimum von c.

Wirkung von Antialexin gemäß dem Massenwirkungsgesetz.
a = Menge des Immunkörpers, b des Alexins, c des Antialexins.

a	b	c	c : b	c : a
1000	5,1	7130	1400	7,1
300	5,4	2270	450	7,6
100	6,3	885	141	8,9
70	7,0	690	99	9,9
50	8,4	606	72	12,1
30	15	670	45	22,3
25	25	950	38	38,1

Wenn wir nun diese letzte allgemeine Tabelle mit denen von Sachs und Morgenroth vergleichen, so sehen wir, daß diese alle innerhalb der Beobachtungsfehler sehr gut als besondere Teile der allgemeinen Tabelle betrachtet werden können, und nicht den Schluß zu ziehen erlauben, den die Verfasser in die Worte fassen:

„Aus dieser Tatsache geht mit Notwendigkeit hervor, daß die Aviditätverhältnisse allein nicht zur Erklärung ausreichen können. Wir müssen vielmehr einen zweiten Faktor, die Pluralität der Komplemente und Antikomplemente, zur Erklärung heranziehen."

Dieses Beispiel zeigt deutlich, wie vorsichtig man mit theoretischen Deduktionen in diesem Teile der Biochemie sein sollte und wie berechtigt die Worte Bashfords[1]) sind, mit denen er eine seiner Abhandlungen einleitet: „Auf dem Gebiete der Immunität insbesondere sind die Untersuchungen durch die Gewohnheit erschwert, häufig mit den Schlüssen weiter zu gehen, als die Tatsachen garantieren: unvoreingenommene Arbeit und Urteil führen nur zu oft zu dem Schluß, daß die ‚allgemein anerkannten Tatsachen' nur unsicher begründete Hypothesen sind."

Die Verhältnisse erfahren eine weitere Komplikation durch die

[1]) Bashford, Journal of pathology and bacteriology 8, 52 (1902).

Digitized by Google

Möglichkeit, daß das Verhältnis der Absorption von Immunkörper und Antialexin in verschiedenen Fällen verschieden sein kann.

In zwei meisterhaften Abhandlungen hat Bordet[1]) die Eigenschaften von Antiseren, dargestellt durch Injektion von normalem oder Immunserum in die Venen eines nicht verwandten Tieres, behandelt. Bordet fand, daß Serum von einem Meerschweinchen, das mit Kaninchenerythrocyten behandelt worden war, einem Kaninchen eingespritzt, die Entstehung von Substanzen hervorruft, die sowohl dem Immunkörper, der im Immunserum des Meerschweinchens enthalten ist, entgegenwirken, wie auch dem Alexin im normalen Meerschweinchenserum. Die antialektische Wirkung schützte nicht nur Kaninchenerythrocyten, die mit dem genannten Immunserum behandelt wurden, vor Hämolyse, sondern auch Choleravibrionen, die mit bakteriolytischem Choleraserum behandelt worden waren, vor Zerstörung durch Meerschweinchenserum. Diese antialektische Wirkung war insofern spezifisch, als sie nicht gegen andere Alexine als das aus Meerschweinchen schützte.

Bordet stellte mit folgender Kombination eine große Menge Versuche an: Erythrocyten: aus Ochsen; Immunkörper: Serum eines mit Ochsenerythrocyten behandelten Kaninchens; Alexin: normales Meerschweinchenserum; Antiserum: Serum eines mit normalem Kaninchenserum behandelten Meerschweinchens. Der Immunkörper und das Antialexin wurden vom Alexin durch halbstündiges Erhitzen auf 55—56° getrennt. Bordet benutzte, um die wirksamen Substanzen von der großen Anzahl anderer in den Seren anwesenden Substanzen zu trennen, die Methode, sie durch Erythrocyten auszuschütteln, es waren dann nur die gegen die betreffenden Erythrocyten spezifischen Substanzen imstande, ihre Wirksamkeit zu zeigen. Daß die Erythrocyten den Immunkörper, wenn er nicht in großem Überschuß zugegen ist, nahezu vollständig absorbieren, haben wir oben gesehen, und diese Methode ist schon lange zur Extraktion von Immunkörpern aus Seren in Gebrauch. Bordet hat gezeigt, daß mit Immunkörper beladene Erythrocyten auch Alexine absorbieren, so daß ein Serum auf diese Weise von seinem Alexingehalt befreit werden kann, was dadurch bewiesen wird, daß es keine hämolytische Kraft gegen Erythrocyten, die mit Immunkörper behandelt sind, mehr hat. Dagegen wird das Alexin von Erythrocythen, die keinen Immunkörper enthalten, nicht absorbiert. Weiter beweist Bordet in ähnlicher

[1]) Bordet, Ann. de l'inst. Pasteur, 18, 593 (1904). Bordet und Gay, ebenda 20, 467 (1906).

Digitized by Google

Weise, daß mit Immunkörper beladene Erythrocyten das Antiserum absorbieren und dadurch ihre Fähigkeit, Alexin zu absorbieren, verlieren. Offenbar wird der Immunkörper von dem Antiserum gebunden, das eine stärkere Affinität zu dem Immunkörper zu haben scheint als das Alexin. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, daß eine bestimmte Antiserummenge nur eine gegebene äquivalente Menge Immunkörper binden kann, so daß Erythrocyten, die durch Absorption einer bestimmten Menge Antiserum gegen Hämolyse geschützt sind, durch Zusatz von mehr Immunkörper und Alexin hämolysiert werden können. Normales, auf 56° erhitztes Kaninchenserum enthält eine Substanz, die gegen Rinderythrocyten nicht als Immunkörper auftritt, aber die Fähigkeit hat, Antiserum zu binden, so daß sie die Hämolyse von Erythrocyten bewirkt, die mit der Verbindung von Immunkörper und Antiserum beladen sind. Die hämolytische Wirkung ist geringer, wenn die Verbindung lange in den Erythrocyten bestanden hat, als wenn das Präparat frisch ist. Daraus scheint hervorzugehen, daß die Verbindung in derselben Weise wie die analogen hämolytischen Substanzen, wie Tetanolysin und wahrscheinlich auch die zusammengesetzten Hämolysine, in den Erythrocyten langsam von Proteinsubstanzen gebunden wird. Das normale Kaninchenserum enthält offenbar irgendeine Substanz, die mit dem Immunkörper um das Antiserum konkurriert.

Bordet und Gay machten eine Beobachtung, die eine von Klein entdeckte Tatsache bestätigt.[1]) Die in den Seren enthaltenen Immunkörper und Agglutinine werden von den Erythrocyten viel stärker absorbiert, wenn diese in physiologischer Salzlösung, als wenn sie in normalem Serum suspendiert sind. Der Zusatz physiologischer Salzlösung erhöht die Absorption sehr. So wurde eine Mischung von 0,4 ccm normalem Pferdeserum und 0,4 ccm Meerschweinchen-Erythrocyten mit 1 ccm Ochsenserum behandelt, ohne daß sich eine stärkere Agglutination der Erythrocyten gezeigt hätte. In Anwesenheit von 0,6 ccm physiologischer Salzlösung dagegen war die Agglutination sehr stark. Analog läßt sich eine andere Beobachtung von Bordet erklären. 0,2 ccm mit Immunkörper beladene Ochsenerythrocyten wurden mit 0,2 ccm Antiserum und physiologischer Salzlösung gemischt. Nach einiger Zeit wurde die Flüssigkeit von den Erythrocyten abgeschleudert. Darauf wurde den Erythrocyten eine Mischung von 0,2 ccm Alexin aus Meerschweinchen und 0,6 ccm auf 56° erhitztes normales Meerschweinchenserum zugesetzt. Ein zweites Ex-

[1]) Klein, Wiener klin. Wochenschrift, 1905, Nr. 48.

Digitized by Google

periment war ganz ebenso, nur wurden die 0,6 ccm Meerschweinchenserum durch 0,6 ccm physiologischer Salzlösung ersetzt. Bei dem ersten Versuch wurde keine Hämolyse beobachtet, der zweite ergab Hämolyse im Laufe einer Stunde. Die Absorption des Alexins war in Gegenwart der physiologischen Salzlösung viel größer, als in Gegenwart des normalen Serums. Das absorbierte Alexin konkurriert mit dem in den Erythrocyten absorbierten Antiserum, so daß eine bestimmte, zur Hervorrufung von Hämolyse genügende Menge Hämolysin sich bildet.

Diese Wirkung der physiologischen Salzlösung, die bei dem Versuch von Bordet und Gay die Absorption des Immunkörpers und Alexins aus Pferdeserum bewirkte, spricht sehr zugunsten der Anschauung, daß eine Absorption und nicht eine chemische Bindung des Immunkörpers in den Erythrocyten vorliegt.

Bordet bewies durch Absorptionsversuche, daß dasselbe Antiserum Ochsenerythrocyten gegen den Immunkörper, der in dem Serum eines mit Ochsenerythrocyten behandelten Kaninchens enthalten ist, und Hühnererythrocyten gegen Serum von mit Hühnererythrocyten behandelten Kaninchen beschützt. Dasselbe Antiserum vermag also zwei völlig verschiedene Immunkörper zu neutralisieren, die von derselben Tierart (hier Kaninchen) hervorgebracht sind. Daher kann Bordet dem Beweis von Ford[1]) und Wassermann[2]) nicht beistimmen, wonach das im normalen Kaninchenserum enthaltene Agglutinin gegen Hühnererythrocyten mit dem im Serum der mit solchen Erythrocyten behandelten Kaninchen enthaltenen Agglutinin identisch ist, weil beide von Serum aus Hühnern, die mit Kaninchenerythrocyten behandelt sind, neutralisiert werden.

Bordet knüpft einige Bemerkungen von großem theoretischen Interesse an die Resultate seiner Versuche. Ehrlich und Morgenroth[3]) fanden, daß man bei der erwähnten Kombination von Erythrocyten und Immunkörper Alexin aus Ziegenserum anwenden kann, wenn es auch eine schwächere hämolytische Wirkung als das aus Meerschweinchen hat. Dann machten sie Versuche über die neutralisierende Wirkung eines Antiserums, das durch Injektion des Serums eines mit Ochsenerythrocyten behandelten Kaninchens in die Venen einer Ziege bereitet war. Sie fanden, daß dieses Serum (in gegebener Menge) die Hämolyse durch Alexin aus Meerschweinchen hinderte, nicht aber die durch Ziegenserum. Aber da das Alexin aus Ziegen viel schwächer

[1]) Ford, Zeitschr. f. Hygiene 40, 363 (1902).
[2]) Wassermann, ebenda, 42, 267 (1903).
[3]) Ehrlich und Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 21 u. 22.

Digitized by Google

ist, benutzten sie in diesem besonderen Falle eine weit größere Menge Immunkörper als sonst. Dabei führten sie nicht nur eine große Menge Immunkörper ein, sondern auch die in normalem Kaninchenserum enthaltenen Substanzen, die das Antiserum zu neutralisieren vermögen. Bordet erklärt auf diese einfache Weise, warum das Antiserum hier keine Wirkung hatte, und verwirft die Erklärung von Ehrlich und Morgenroth, die annehmen, daß der verschiedene Effekt auf die Gegenwart zwei verschiedener Immunkörper zurückzuführen ist, von denen der eine mit dem Alexin aus Meerschweinchen und dem besagten Antiserum eine Verbindung eingeht, das andere mit Alexin aus Ziegen, aber nicht mit dem Antiserum. Offenbar ist der Beweis dieser Auffassung nicht stichhaltig.

Eine andere Bemerkung von Bordet bezieht sich auf die Seitenkettentheorie Ehrlichs. Ehrlich stellt sich die Bildung der Antikörper folgendermaßen vor. Wenn ein fremder Stoff in den Körper eines Tieres injiziert wird, so kann er in einer Zelle der Gewebe des Tieres „verankert" werden. Eine chemische Affinität (Receptor) dieser Zelle wird dadurch gebunden und die Zelle dadurch an einer ihrer Funktionen verhindert. Die Zelle erzeugt jetzt einen neuen Receptor zum Ersatz des von dem fremden Stoffe besetzten. Nach einem von Weigert formulierten Gesetz kompensiert die Regeneration nicht nur den Defekt, sondern überkompensiert ihn. (Dieses sogenannte Gesetz wird durchaus nicht als solches anerkannt.) Der Überschuß an gebildetem Receptor geht mit den benachbarten Teilen der Zelle ins Blut über und bildet das Antitoxin. In unserem Falle also ist nach Ehrlich der Immunkörper ein Receptor, der einen Erythrocyten zu binden imstande ist. — Dieser Receptor heißt Amboceptor, weil er auch ein Molekül Alexin zugleich mit dem Erythrocyten zu binden vermag. — Nun haben wir gesehen, daß die Immunkörper von den Erythrocyten nicht gebunden, sondern nur absorbiert werden. Daher verwerfen wir die Seitenkettentheorie. Bordet andererseits hält an der Vorstellung eines Bindungsprozesses von der Art der Färbung der Faser durch Farbstoffe fest. Er sucht daher nach einem anderen Beweis, daß die Theorie von Ehrlich, so wie sie benutzt wird, nicht richtig sein kann. Um die Wirkung der Antiseren zu erklären, die durch Injektion eines Immunkörpers erzeugt werden, nimmt Morgenroth an, daß sie aus Receptoren bestehen, die dieselbe Affinität des Immunkörpers binden, wie sonst die Erythrocyten. (Offenbar wäre es viel besser gewesen, anzunehmen, daß die Antiseren die Alexine ersetzen und daher die Affinität, mit der ein Erythrocyt gebunden werden kann, nicht angreifen.) Aber dann — sagt Bordet — müßten

Digitized by Google

die Substanzen, die das Antiserum zu binden vermögen, auch Erythrocyten binden. Wie wir gesehen haben, enthält normales Kaninchenserum einen Stoff, der sich mit dem angewandten Antiserum, aber nicht mit den Ochsenerythrocyten verbindet. Selbst Immunserum aus Kaninchen, behandelt mit Ochsenerythrocyten, welches Serum vorher durch Schütteln mit Ochsenerythrocyten der Stoffe, die diese Erythrocyten binden, beraubt worden war, zeigte Affinität gegen Antiserum. Ferner bindet dasselbe Antiserum Immunkörper, die von verschiedenen Erythrocyten absorbiert werden (z. B. Ochsen- und Hühnererythrocyten) und die spezifisch gegen diese sind.

Bordet greift auch Morgenroths Beweis[1]) an, wonach Immunkörper und Alexin einander in Lösung binden. Da Morgenroth zugegeben hat, daß die Kritik Bordets wohlbegründet ist,[2]) wollen wir hier auf diese Streitfrage nicht eingehen. Es sei nur bemerkt, daß die Verbindung stark dissozierbar ist, und daß daher ein Beweis ihrer Existenz nur mit Hilfe quantitativer Messungen hätte erbracht werden können (vgl. S. 147). Da diese Verbindung in den Erythrocyten besteht, scheint es sehr unwahrscheinlich, daß sie nicht auch außerhalb der Erythrocyten bestehen sollte, wenn auch stark dissoziert.

Wie wir oben gesehen haben, machten Ehrlich und Sachs hämolytische Versuche mit Erythrocyten aus Meerschweinchen, normalem auf 56° erhitzten Rinderserum (das sie als Immunkörper ansahen) und Alexin aus Pferdeblut. Sie fanden, daß das hämolytische Agens aus dem Rinderserum von den Erythrocyten nicht absorbiert wird, denn das Serum verlor seine Wirksamkeit durch Schütteln mit solchen Erythrocyten nicht. Daraus schlossen sie, daß nicht der Immunkörper, sondern seine Verbindung mit Alexin von den Erythrocyten absorbiert wird. Dieser Schluß wird durch die Untersuchung von Bordet und Gay nicht bestätigt, denn sie konnten Hämolyse feststellen, wenn sie an Stelle des Pferdealexins solches aus Ziege anwandten. Wenn aber der Immunkörper aus dem Rinderserum durch Behandlung mit Meerschweinchenerythrocyten entfernt worden war, trat keine Hämolyse ein. Der Versuch von Ehrlich und Sachs muß daher anders gedeutet werden. Nach einer gründlichen Untersuchung kommen Bordet und Gay zu dem Schluß, daß das normale Pferdeserum, dessen sich Ehrlich und Sachs bedienten, den Erythrocyten nicht nur das Alexin, sondern auch den Immunkörper liefert. Das aus diesen beiden Sub-

---

[1]) Morgenroth, Centralblatt für Bakteriologie 35, 501 (1904).

[2]) Morgenroth, Arbeiten aus dem pathologischen Institut zu Berlin 1906, S. 6.

Digitized by Google

stanzen zusammengesetzte Hämolysin ist zu schwach, um eine merkliche Hämolyse hervorzurufen, wird aber durch eine Substanz verstärkt, die in dem Rinderserum enthalten ist und die sie „colloïde de boeuf" nennen. Dieses Kolloid ist auch in einigen verwandten Fällen wirksam. Der Beweis von Ehrlich und Sachs, daß ein Immunkörper für sich allein nicht löslich in Erythrocyten ist (von ihnen nicht gebunden wird), sondern erst nach Vereinigung mit Alexin, ist daher unhaltbar.

Ich habe einige Versuche über die Wirkung von Antialexinen gemacht und Fälle gefunden, in denen die Wirkung des Antialexins bei einer mittleren Konzentration des Immunkörpers ein Minimum statt eines Maximums wie bei dem besprochenen theoretischen Beispiele hat. In dem einen Fall waren die Erythrocyten aus Schafblut (1 ccm einer 5prozentigen Emulsion), der Immunkörper a aus einer mit Schaferythrocyten behandelten Ziege, das Alexin b war Meerschweinchenserum und das Antialexin c stammte aus einer mit Kaninchenserum behandelten Ziege. Die Alexinmenge war so bemessen, daß drei Viertel davon gerade hingereicht hätten, um vollständige Hämolyse zu erzeugen. Die Mengen sind in ccm der benutzten Präparate angegeben. Die Versuchsmethode war dieselbe, die Morgenroth und Sachs benutzt haben. Das gesamte Volumen war 2,2 ccm. Die Zahlen der Tabelle bedeuten Hämolysegrade.

Wirkung verschiedener Antialexinmengen.

	Ser. 1	Ser. 2	Ser. 3	Ser. 4
c (ccm)	a = 0,1 ccm b = 0,004 ccm	a = 0,01 ccm b = 0,015 ccm	a = 0,001 ccm b = 0,04 ccm	a = 0,0005 ccm b = 0,1 ccm
0	100	100	100	100
0,025	67	100	100	100
0,035	48	100	100	90
0,05	22	100	100	81
0,075	14	100	54	36
0,1	9	90	4 (?)	13
0,15	6	28	4	8
0,25	8	12	6	8
0,35	8	7	6	9
0,5	10	8	8	9

Die Wirkung ist am geringsten in Serie 2, dann kommt Serie 3, dann Serie 4 und zuletzt Serie 1. Es scheint schwierig, dieses eigentümliche Verhalten, das durch weitere Messungen bestätigt wurde, zu erklären, wenn wir annehmen, daß das Antialexin nur mit dem anwesenden Alexin eine Verbindung eingeht. Die Beobachtungen lassen

Digitized by Google

sich dagegen verstehen, wenn wir annehmen, daß entweder ein Antiimmunkörper oder ein Antihämolysin zugegen war. Wenn wir annahmen, daß das Präparat c sowohl Antiimmunkörper wie Antialexin enthielt und daß die Affinitäten stark sind, dann können kleine Mengen von c genügen, um eine beträchtliche Neutralisation hervorzubringen, wenn entweder das Alexin (Serie 1) oder der Immunkörper (Serie 4) in geringerer Konzentration anwesend ist. Die Erklärung ist ähnlich (infolge der partiellen Dissoziation), wenn wir annehmen, daß in der Lösung c ein Antihämolysin zugegen ist.

Auf alle Fälle sind die Reaktionen in Gegenwart von Antialexinen oder Antiimmunkörper ziemlich kompliziert und schwer zu übersehen.

Kapitel 9: Die Präzipitine.

In vielen Fällen sind die Reaktionsprodukte eines Fermentes feste Körper, und solche Fermente nennt man Präzipitine. Gewöhnlich enthalten diese festen Stoffe beträchtliche Mengen Wasser, wie Eiweißsubstanzen im allgemeinen, und dadurch hat man sich in neuerer Zeit auf die Idee bringen lassen, daß der Vorgang der Präzipitation in nichts anderem als einer Zusammenflockung und Sedimentation der „kolloidalen" Teilchen der in der Lösung vorhandenen, dem Angriff unterworfenen Eiweißstoffe besteht. Nach dieser Theorie ist z. B. das Kasein in der Milch in Form einer sogenannten Pseudolösung vorhanden. Seine kleinsten Teilchen können als ein äußerst feines festes Pulver von submikroskopischen Dimensionen betrachtet werden (Dimensionen unter 0,0002 mm). Durch Zusatz von Lab sammeln sich diese kleinen Teilchen zu größeren Klumpen und setzen sich zu Boden, genau wie fein gepulverter Ton nach Zusatz von Salzen oder Säuren zu dem Wasser, in dem er schwebt, zu Boden sinkt.

Zur Stütze dieser Auffassung führt Duclaux[1]) folgende Beobachtung an. „In Milch, die sauer zu werden beginnt, aber noch völlig flüssig ist, beobachten wir mit dem Mikroskop, wie ich ausgeführt habe, einen Niederschlag von feinen Körnchen, der im Anfang nur schwierig zu sehn ist, und nur als eine schwache Trübung des Gesichtsfeldes erkennbar ist, später aber deutlich Körner zeigt, die durch die Brownsche Bewegung charakterisiert sind, genau wie kleine Tonteilchen. Sollen wir annehmen, daß die Koagulation des Kaseins

[1]) Duclaux, Microbiologie, Tome 2, S. 255—339 (1899).

Digitized by Google

plötzlich ihre Natur verändert, in dem Augenblick, wo wir imstande sind, ihren Fortschritt zu entdecken? Von diesem Augenblick an offenbart sich die Erscheinung unseren Augen als eine stetig zunehmende molekulare Kondensation. Sie bietet den Anblick von Tonteilchen, die zusammenflocken und zu Boden sinken. . . . Wir werden daher auf die Annahme geführt, daß diese regelmäßige Kondensation, die, sobald wir etwas sehen können, als die Ursache der Koagulation erscheint, schon beginnt, ehe das Mikroskop sie entdeckt. Aber, wie wohl begründet diese Induktion uns auch erscheinen mag, sie würde etwas in der Luft schweben, wenn wir sie nicht mit dem Experiment kontrollieren könnten."

Diesen experimentellen Beweis findet Duclaux in der Reaktion von Tyndall. Submikroskopisches, in einer vollständig klar aussehenden Flüssigkeit schwebendes Pulver gibt sich durch einen blauen Schein an den Punkten, wo es durch einen Lichtstrahl erleuchtet ist, zu erkennen, und dieses reflektierte blaue Licht ist polarisiert. Diese Erscheinung tritt z. B. in einer Suspension feiner Mastixteilchen auf, die man bereitet, indem man einige Tropfen einer alkoholischen Mastixlösung zu Wasser gibt. Wenn wir größere Mengen der Lösung zusetzen, so wird das reflektierte Licht immer blasser und weißer und in einem bestimmten Augenblick wird es möglich, mit dem Mikroskope in der Lösung kleine Teilchen zu entdecken, die die Brownsche Bewegung zeigen. Bei einer noch größeren Konzentration der Lösung bildet sich eine wirkliche Fällung, die mit bloßem Auge leicht zu sehen ist.

Diesem Argument kann noch eins hinzugefügt werden. Solche ultramikroskopischen Partikel lassen sich mit Hilfe von Siedentopfs Ultramikroskop wahrnehmen. Lösungen von Eiweißstoffen zeigen im allgemeinen die Anwesenheit solcher ultramikroskopischer Körnchen an, und diese Beobachtung ist zugunsten der Anschauung gedeutet worden, daß alle Lösungen von Eiweißkörpern Pseudolösungen sind, d. h. aus Emulsionen fein verteilter Teilchen bestehn. Gegen diese Auffassung kann andererseits angeführt werden, daß die Gegenwart einiger submikroskopischer Teilchen durchaus nicht beweist, daß die ganze oder auch nur ein beträchtlicher Teil der in Lösung befindlichen Proteidmenge im Zustand der Pseudolösung vorhanden ist.

Auch hier haben einige Salze, besonders die des Calciums, Strontiums und Baryums einen beträchtlichen Einfluß, ebenso wie bei der Agglutination, mit der die Koagulation viele Analogien zeigt (vgl. S. 108). Ebenso wie Salze einen großen Einfluß auf die Zusammenballung feiner Teilchen von Ton und Mastix z. B. haben

Digitized by Google

(vgl. S. 102 u. f.), ist auch bei der Koagulation die Wirkung der Kalk-, Strontian- und Barytsalze so ausgesprochen, daß es sogar zweifelhaft ist, ob irgendwelche Koagulation in ihrer Abwesenheit vor sich geht. Diese Salze geben für sich allein und ohne Anwesenheit von Lab Niederschläge mit Milch oder Kaseinlösungen. Die koagulierte Masse ist flockiger und hüllt die Fetttröpfchen weniger ein, als der mit Lab bereitete Niederschlag. Aber diese Salzwirkung scheint den Metallen der Calciumgruppe ziemlich spezifisch zu sein. Ihnen am nächsten kommen die Magnesiasalze, die die Koagulation mittels Lab beschleunigen, wenn sie in größerer Menge zugegen sind. Geringe Mengen von $MgCl_2$ verzögern dagegen nach Lörchers Beobachtungen die Wirkung des Labs, während Ca-, Sr- und Ba-Salze sie auch in den geringsten Spuren beschleunigen. $MgCl_2$ gibt für sich allein, ohne Lab, ein Koagulum mit dem Kasein der Milch, Salze der Alkalimetalle koagulieren die Milch nur in hoher Konzentration, die koagulierende Wirkung des Labs verzögern sie. In starker Lösung verzögern auch die Salze von Ca, Sr und Ba die Wirkung des Labs. Die Wirkung starker Lösungen beruht wahrscheinlich auf einer Änderung der Löslichkeit, ähnlich wie die Fällung des Kaseins durch Alkohol, und hat daher nur sekundäres Interesse.

Säuren fällen das Kasein in ziemlich geringer Konzentration, Salze mit saurer Reaktion beschleunigen die Wirkung des Labs, ebenso wie Säuren. Umgekehrt hindern oder verzögern Alkalien die Fällung des Kaseins und ebenso verhalten sich Salze mit alkalischer Reaktion, wie die Karbonate und Bikarbonate der Alkalimetalle.

Diese letzten Tatsachen sprechen sehr zugunsten der chemischen Theorie, die zuerst von Hammarsten ausgesprochen wurde, der das Kasein als eine schwer lösliche Säure betrachtet, deren Alkalisalze leicht löslich sind.

Sackur und Laqueur[1]) haben neuerdings das Äquivalentgewicht des Kaseins, als Säure betrachtet, gleich 1135 gefunden. Das Molekulargewicht scheint, wenn man eine Regel von Ostwald auf die Leitfähigkeit des Natriumsalzes anwendet, 4- bis 6mal so groß als das Äquivalentgewicht zu sein. Hedin, Blum und Vaubel[2]) hatten aus rein chemischen Gründen auf ein Molekulargewicht von etwa 6600 geschlossen.

Auf diese Anschauung begründete Hammarsten seine Methode, reines Kasein zu bereiten. Milch wird mit dem drei- bis vierfachen

---

[1]) Sackur, Zeitschr. f. phys. Ch. 41. 676 (1902).
[2]) Hedin, Blum und Vaubel, Journal f. prakt. Ch. 60, 55 (1899).

Digitized by Google

Volumen Wasser verdünnt und durch Zusatz von 0,1 % Essigsäure eine Fällung erzeugt. Der Niederschlag wird durch Filtration durch Leinwand von der Lösung getrennt und dann in einer schwachen Lösung von Ätznatron oder besser Ammoniak aufgelöst. Die von der Fällung mitgerissenen Fetttröpfchen scheiden sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit ab, die klare Flüssigkeit wird von neuem gefällt, der Niederschlag wieder aufgelöst und das vier- bis fünfmal wiederholt. Die letzten Spuren des Fettes werden dem Niederschlag durch Extraktion mit Alkohol und Äther entzogen. Darauf wird er getrocknet und bildet ein weißes Pulver, Kasein, das sehr wenig löslich in Wasser ist. Seine Emulsion in Wasser verhält sich wie eine Säure und treibt die Kohlensäure aus den Karbonaten der Alkalimetalle und des Calciums aus, wobei sich in Wasser klar lösliche Salze bilden.

Wenn die Lösung des Calciumkaseates durch verdünnte Phosphorsäure neutralisiert wird, so bildet sich eine Fällung von Calciumphosphat und eine weiße Flüssigkeit bleibt zurück, die große Ähnlichkeit mit entrahmter Milch hat. Hier haben wir wahrscheinlich eine Pseudolösung von Kasein vor uns. Sie wird von Lab genau wie Milch zum Gerinnen gebracht.

Die Anhänger der chemischen Theorie der Labwirkung nehmen an, daß dieses Ferment eine zersetzende Wirkung auf Kasein hat, wie Pepsin auf Eiweiß.[1]) Wir haben S. 40 einige sehr starke Argumente zugunsten dieser Ansicht angeführt, nämlich daß die Reaktion bei niederer Temperatur ohne Koagulation vor sich geht, die augenblicklich eintritt, wenn sich die Temperatur über 25° erhebt,[2]) und den stark verzögernden Einfluß kleiner Peptonmengen. Eins der Zersetzungsprodukte, das Parakasein genannt wird, soll bei höherer Temperatur die Fällung bilden, während ein anderes Produkt, sogenanntes Serumalbumen, in Lösung bleibt. Tatsächlich hat Hammarsten bewiesen, daß Serumalbumen eine albuminöse Substanz mit charakteristischen Reaktionen ist, von Säuren (Essig- und Salpetersäure) nicht gefällt wird, ebensowenig von verdünnten Lösungen von

---

[1]) Nach neueren Untersuchungen von Bang (Zeitschr. f. physiol. Ch. 43, 358, 1905), Hemmeter (Berl. klin. Wochenschr. Ewald-Nummer S. 14, 1905) und Schmidt-Nielsen (Zeitschr. f. physiol. Ch. 48, 92, 1906) sind Pepsin und Chymosin — die milchkoagulierende Substanz in neutralem Lab — verschiedene Stoffe. Pepsin scheint in saurer Lösung Milch zu koagulieren, wodurch die Resultate von Pawlow und Sawjalow ihre Erklärung finden.

[2]) Dies wurde zuerst von Morgenroth beobachtet, Archives internationales de pharmacodynamie 1, 265 (1900).

Digitized by Google

$CuSO_4$, $HgCl_2$, $FeCl_3$, $K_4(CN)_6Fe$ und $Pb(CH_3CO_2)_2$, die Hellersche Reaktion nicht, dagegen wohl die Biuret- und die Millonsche Reaktion gibt, durch Tannin in essigsaurer Lösung und durch Alkohol gefällt wird. Lab und Kasein bilden auch in Abwesenheit von Calcium- und Baryumsalzen Serumalbumen.

Duclaux bekämpft diese Anschauung und sagt, daß sie zu dem Schluß führt, daß die löslichen Produkte durch ein Chamberland-Filter gehn müßten. Nun läßt ein Chamberland-Filter kein Kasein durch, dagegen einige Proteide, die sich in der Milch finden. Daher sollte, nach Duclaux, Milch, die durch Lab koaguliert ist, mit einem Chamberland-Filter ein an löslichen Proteiden reicheres Filtrat geben, als andere. Das ist, wie er zeigte, nicht der Fall. Aber der Schluß scheint nicht ganz überzeugend. Denn gerade da das Kasein nicht durch das Filter geht, könnte man annehmen, daß auch das Serumalbumen davon zurückgehalten wird. Daß das Kasein nicht durch das Filter geht, erklärt Duclaux als eine Folge seines pseudogelösten Zustandes, was aber nur eine Ausdrucksform und keine wirkliche Erklärung ist. Dieselbe Erklärung könnte man auf das Serumalbumen anwenden, besonders wenn das Filter von einem Kasein-Gel bedeckt ist.

Der Zusatz eines Oxalates oder Fluorides in Lösung zur Milch verhindert ihre Gerinnung. Man könnte annehmen, daß diese Wirkung auf der Ausfällung der in der Milch und dem Lab enthaltenen Calciumverbindungen beruht. Duclaux widerspricht dieser Auffassung, weil die Gerinnung nur dann unterdrückt wird, wenn das Oxalat oder Fluorid im Überschuß anwesend ist. Vom modern physikalisch-chemischen Standpunkt scheint es ziemlich klar, daß zur Koagulation eine bestimmte Konzentration des Calcium- (oder Strontium-, Baryum-) Ions nötig ist, und daß die Konzentration dieser Ionen um so kleiner wird, je mehr Oxalat zugegen ist. Es ist daher eine bestimmte Konzentration des freien Oxalat- (oder Fluor-)Ions nötig, um die Gerinnung zu hindern. Diese Konzentration verschiebt sich wahrscheinlich mit der Temperatur. Duclaux nimmt an, daß das Oxalat oder Fluorid einen Einfluß auf die Mich selbst hat und ihr Gerinnungsvermögen zerstört.

Ein anderer Koagulationsprozeß von hervorragendem Interesse ist die Fällung des Blutplasmas durch Fibrinferment. Dieser Vorgang ist der Gerinnung der Milch und des Kaseins sehr ähnlich, aber scheint sich insofern davon zu unterscheiden, als die Gerinnung des Plasmas freiwillig vor sich geht. Nach Duclaux beruht das auf der Wirkung der im Blut anwesenden Leukocyten. Wenn diese

Digitized by Google

sterben, scheiden sie ein koagulierendes Ferment aus. Solche Fermente, die Blutplasma zu Gerinnen bringen, sind in den Geweben, Flüssigkeiten und Organen des Körpers sehr verbreitet. Alexander Schmidt bereitete dieses Fibrinferment, indem er Blutserum mit dem 15- bis 20fachen Volumen Alkohol fällte. Die Fällung wurde filtriert und getrocknet. Dieser Niederschlag enthält eine ziemlich große Menge Fibrinferment, das das im Blut enthaltene Fibrin koaguliert.

Man kann sowohl Plasma- wie Fibrinfermentlösungen fast frei von Calciumsalzen erhalten, indem man ein Oxalat oder Fluorid zu dem Präparat zusetzt. Wenn man die beiden Flüssigkeiten mischt, tritt Koagulation ein, auch wenn Oxalationen im Überschuß vorhanden sind. Aus diesem Versuch hat man geschlossen, daß Calciumionen für die Gerinnung des Fibrins nicht nötig sind. Der Schluß ist nicht ganz bindend, denn es sind immer Calciumionen zugegen, wenn auch in sehr geringer Menge. Eine genauere Prüfung dieser Frage wäre nicht ohne Interesse. Aber es ist sicher, daß die Ionen des Calciums, Strontiums und Baryums in hohem Maße die Koagulation des Fibrins beschleunigen. Bordet und Gengou[1]) behaupten, daß das Fibrinferment bei der Fällung der Calciumionen durch Fluorid mitgerissen wird, bei der Ausfällung durch Oxalat dagegen nicht. Sie glauben auch nachgewiesen zu haben, daß bei der plasmatischen Koagulation eine Verwandlung von Fibrinogen in Fibrin auch in Abwesenheit von Calciumionen stattfindet. Der Gerinnungsprozeß erfordert aber die Anwesenheit des Ca-Ions. Im ganzen scheinen die verschiedenen Salze einen ähnlichen Einfluß auf die Gerinnung des Fibrins auszuüben, wie auf die der Milch. Anwesenheit von Säuren ist der plasmatischen Koagulation günstig.

Leo Loeb[2]) fand eine gewisse Spezifität zwischen Fibrinferment und Plasma, „insofern das Blut jeder Tierart schneller unter dem Einfluß der tierischen Gewebe seiner eigenen Art oder einer verwandten Art koagulierte, als unter dem Einfluß der Gewebe einer entfernteren Art." Zusatz von Serum des Tieres, von dem das Fibrinferment stammt, beschleunigt die Wirkung. Auch die Produkte von Bakterien (besonders Streptococcus pyogeneus aureus) begünstigen manchmal die Koagulation.

Man kennt noch einen dritten, durch ein Ferment hervorgerufenen

---

[1]) Bordet und Gengou, Ann. de l'inst. Pasteur 88, S. 26 u. 89 (1904).

[2]) Leo Loeb, Hofmeisters Beiträge, 5, 534 (1904); Journ. of medical research 10, 407 (1903).

Digitized by Google

Fall von Koagulation. In manchen Früchten und auch in Pflanzenwurzeln findet sich eine Substanz, die Pektin genannt wird. Diese Substanz gibt mit Wasser eine stark viskose Lösung, und wird von Alkohol gefällt. Sie gerinnt unter der Einwirkung eines Fermentes, das Pektase genannt wird und sich in dem Safte von Möhren, Rüben und anderen Pflanzen findet. Diese Koagulation wird durch die Anwesenheit von Oxalationen verhindert, d. h. die Anwesenheit von Calciumionen (oder Ionen des Baryums und Strontiums) scheint dazu notwendig. Säuren verzögern die Koagulation und starke Säuren, wie Salzsäure, haben einen stärkeren Einfluß als schwache, z. B. Malonsäure.

Koagulation und Präzipitation spielen in der Chemie der Antikörper eine bedeutende Rolle. Wir haben schon besprochen, daß die Wirkung der Agglutinine wahrscheinlich in einem koagulierenden Einfluß auf die Zellen besteht (vgl. S. 108). Die Agglutination von Erythrocyten durch Säuren hat eine sehr deutliche Koagulation im Gefolge. Merkurichlorid bewirkt in größerer Konzentration sowohl Koagulation wie Agglutination und in geringer Hämolyse der roten Blutkörperchen. Hämolyse und Koagulation — die sich als Agglutination äußert — scheinen bei den sogenannten Phytalbumosen, Toxinen von pflanzlichem Ursprung, z. B. Ricin und Crotin, so oft einander zu begleiten, daß Ehrlich geradezu annimmt, daß sie in diesem Falle unzertrennlich sind.[1]) Doch ist dies bei den Bakteriolysinen nach Kraus und Ludwig nicht der Fall.[2])

Wenn Toxine und Antitoxine in größerer Konzentration gemischt werden, geben sie oft eine Fällung. So beobachtete z. B. Jacoby[3]) eine flockige Fällung wenn er Ricin mit Antiricin mischte, und Hausmann[4]) machte mit Abrin und Antiabrin eine ähnliche Beobachtung. Bashford[5]) fand, daß das Blutserum eines Kaninchens, das aktiv gegen Crotin immunisiert worden war, mit dieser Substanz einen dicken Niederschlag gab, während normales Serum keinen Niederschlag erzeugte. Myers[6]) zeigte, daß verschiedene albuminöse Stoffe (Witte-Pepton, kristallisiertes Eialbumin, Serumglobulin) mit dem Serum von Kaninchen, denen sie injiziert worden waren, Fällungen

---

[1]) Ehrlich, Schlußbetrachtungen in Nothnagels spez. Pathologie und Therapie 8, 13, Wien 1901.

[2]) Kraus und Ludwig, Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 5.

[3]) Jacoby, Hofmeisters Beiträge 1, 51 (1902).

[4]) Hausmann, ebenda, 2, (1902).

[5]) Bashford, Journ. of pathology etc. 8, 59 (1902).

[6]) Myers, Zentralblatt f. Bakteriologie 38, (1900).

Digitized by Google

gaben, wenn man die beiden Flüssigkeiten in vitro aufeinander wirken ließ.

„Wenn diese Reaktion in vitro", sagt Bashford, „dem Vorgang im Körper vergleichbar ist, dann muß die Injektion einer Lösung von Wittes Pepton in die Ohrvene eines solchen immunisierten Tieres den Tod durch Embolie herbeiführen." „Die sehr langsame Injektion von 5 ccm 20prozentigem Witteschem Pepton in die Ohrvene" (eines hoch immunisierten Kaninchens) „gab indessen keine Symptome." „Die Reaktionen *in vitro* und *in corpore* sind hier wieder einmal verschieden. Auch im Falle eines gegen Crotin immunisierten Kaninchens hatte direkte Injektion von crotinhaltigem Albumin keinen Einfluß, soweit ich beobachten konnte." Wie wir gesehn haben (S. 134), hat die Gleichgewichtsgleichung des Ricins und Antiricins nicht die gleiche Form, wenn man die Wirkung dieses Giftes auf rote Blutkörperchen *in vitro* und wenn man seine Wirkung auf ein lebendes Tier untersucht. Wir müssen daraus schließen, daß zwei verschiedene Gifte wirksam sind. Ehrlich[1]) und Kobert[2]) nahmen an, daß die beiden Gifte identisch sind, und benutzten diese Hypothese als Grundlage theoretischer Deduktionen. Aber heute ist bekannt, daß diese Hypothese falsch war.

Auch bei Tetanolysin und Sublimat stellte Bashford Verschiedenheit der Wirkung *in vitro* und *in vivo* fest. Hämolysine wie Cyklamin, Saponin, Digitalin, Solanin, Cobravenom, und hämolytische Seren erzeugen auch in lebenden Tieren, denen sie injiziert werden, Hämolyse, die sich als Globinurie offenbart. „Es muß aber betont werden, daß die Wirkungen der Hämolysine in corpore in keinem Fall auf die Erythrocyten beschränkt bleiben." Auf alle Fälle scheint es vorsichtiger, nicht a priori vorauszusetzen, daß die Giftwirkungen *in vitro* und *in vivo* identisch sind.

Die bestbekannte aller koagulierenden Substanzen ist das Lab (oder Chymosin). Es scheint recht wahrscheinlich, daß die Hauptwirkung des Labs analog der peptischen Verdauung ist und daß die Koagulation eine mehr zufällige, den Verdauungsprodukten bei höherer Temperatur zukommende Eigenschaft ist (vgl. S. 175). Wie das auch sei, die Koagulation ist die bisher bei der Untersuchung der Wirkung des Labs stets benutzte Erscheinung. Die koagulierende Kraft des Labs wird geschwächt sowohl durch einige normale Seren, besonders Pferdeserum, als auch durch Immunseren, die durch Injektion von

[1]) Ehrlich, Fortschritte der Medizin 15, 41 (1897).

[2]) Kobert, Arbeiten des pharmakologischen Institutes zu Dorpat, Bd. 8 (zitiert nach Bashford).

Digitized by Google

Lab in Tiere — besonders Kaninchen sind für diesen Zweck benutzt worden — erzeugt werden.[1])

Madsen und Walbum haben die neutralisierende Kraft dieses Antilabs studiert und gefunden, daß es sich genau so verhält, wie Antitetanolysin gegen Tetanolysin. Die Versuchsmethode war die folgende: Es wurden Mischungen von 4 ccm 1 prozentiger Lablösung mit wechselnden Mengen (0,02 bis 1 ccm) des das Antilab enthaltenden Serums und soviel physiologischer Salzlösung, daß das ganze Volumen 5 ccm war, hergestellt. Diese Mischungen wurden während 20 bis 50 Minuten bei Zimmertemperatur (im Mittel 16°) gehalten — besondere Versuche scheinen zu zeigen, daß die Reaktionsdauer keinen Einfluß hat, wenn sie nur 5 Minuten übersteigt — und nach Verlauf dieser Zeit wurden verschiedene Mengen dieser Mischungen zu 10 ccm Milch gefügt und mit physiologischer Salzlösung auf 12 ccm aufgefüllt. Die diese Mischungen enthaltenden Probierröhrchen wurden in ein Wasserbad von konstanter Temperatur gebracht und die Gerinnung nach bestimmter Zeit (2 Stunden) geprüft. Die Berechnung der Versuche geschah in derselben Weise, wie beim Tetanolysin. 1 ccm des Antilabs erwies sich als äquivalent mit 1,48 mal der angewandten Menge des Labs. $x = 0{,}012$.

Neutralisation des Labs durch Immunserum aus Kaninchen.

n	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$	$\triangle$	n	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$	$\triangle$
0	100	100	—	0,4	42,6	41,8	$\pm$ 1,3
0,02	97,4	97,1	$\pm$ 0,6	0,5	30,2	28,2	$\mp$ 1,2
0,05	92,3	92,6	$\mp$ 1,4	0,6	16,5	16,3	$\mp$ 0,4
0,1	85,9	85,2	$\mp$ 1,5	0,7	8,2	8,4	$\mp$ 0,6
0,2	70,4	70,6	$\mp$ 1,8	0,8	4,7	4,7	$\mp$ 0,3
0,3	54,3	56,0	$\mp$ 1,9	0,9	2,8	3,1	$\mp$ 0,2

Die Versuche sind ziemlich schwer und deshalb sind eine große Anzahl Beobachtungen vorgenommen worden. Die beobachteten Werte der Stärke des Labs in der Mischung sind Mittelwerte von nicht weniger als 11 verschiedenen Messungen. Dank diesem Umstande war es möglich, den wahrscheinlichen Fehler jedes Wertes zu berechnen. Dieser wahrscheinliche Fehler ist in der Tabelle unter $\triangle$ angegeben. Wie man aus dem Vergleich zwischen $q_{ber.}$ und $q_{beob.}$ sieht, ist der Unterschied zwischen Rechnung und Beobachtung in acht Fällen kleiner als der wahrscheinliche Fehler und überschreitet

[1]) Morgenroth (Zentralblatt f. Bakteriologie, 1. Abt. 26, 349, 1899 und 27, 721, 1900) stellte zuerst Antilab dar. Er immunisierte Ziegen durch subkutane Injektion von Milch, nach wiederholten Injektionen enthielt das Serum der Ziege Antilab.

Digitized by Google

ihn nur in zweien und auch da nicht sehr. Die Übereinstimmung kann glänzend genannt werden und die ganze Reihe, die das kondensierte Resultat von etwa 750 Versuchen darstellt — von jeder Mischung wurden 6 bis 8 verschiedene Dosen in ebenso viele Probierrohre gebracht — kann als ein Vorbild für spätere Untersuchungen dieses schwierigen Gebietes gelten.

Die Übereinstimmung zwischen $q_{beob.}$ und $q_{ber.}$ kann als guter Beweis dafür dienen, daß die zur Berechnung verwandte Formel der richtige Ausdruck für die Erscheinung ist.

Wie schon erwähnt wurde (vgl. S. 2), haben Hammarsten und Rödén [1]) beobachtet, daß normales Pferdeserum eine dem Antilab in vielen Beziehungen ähnliche Substanz enthält. Daher haben Madsen und Walbum auch diesen Antikörper in ähnlicher Art wie Antilab untersucht; nur die Zeit der Reaktion war länger, 2 bis 4 Stunden. Die Resultate der Versuche mit zwei verschiedenen Präparaten sind in der folgenden Tabelle zusammengezogen.

Neutralisation von Lab durch normales Pferdeserum.

n	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$	n	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$
0	100	100	0	100	100
0,1	80	80,2	0,02	93	96,3
0,2	64,3	62,1	0,05	87,3	90,9
0,4	51,7	52,1	0,1	71	82,0
0,8	33,5	28,4	0,2	63,5	65,3
1,0	24,9	22,2	0,3	54,5	49,5
1,2	21,0	18,1	0,4	34,7	38,3
1,35	16,0	15,8	0,5	29,4	28,9
1,5	13,5	14,0	0,6	22,0	22,2
1,7	10,0	12,2	0,8	19,2	14,4
			1,0	9,4	10,3
			1,3	8,7	7,1
			1,7	3,1	5,0
			2,0	2,9	4,0

Dieser Neutralisationsprozeß ist nicht derselben Formel unterworfen wie die Wirkung von Lab auf Antilab, aber die Formel ist dieselbe wie bei der Neutralisation des Tetanolysins durch Cholesterin, woraus hervorgeht, daß ein Molekül Lab und ein Molekül Antikörper ein Molekül Reaktionsprodukt geben. Die Konstanten sind, wenn wir

[1]) Rödén, Upsala läkareförenings förhandlingar 22, 546 (1887). Rödén beobachtete, daß Serum aus Schweineblut nahezu ebenso aktiv ist, wie das aus Pferdeblut. Seren aus Rind und Kaninchen haben eine viel schwächere Wirkung. Die wirksame Substanz wird durch Erhitzen während einiger Minuten auf 70°, auch durch Behandlung mit Alkohol, zerstört.

Digitized by Google

die Konzentration des beim ersten Versuche neutralisierten Labs als Einheit wählen, beim ersten Präparat $x = 0{,}354$ und beim zweiten $x = 0{,}138$. 1 ccm des ersten Serums war 2 mal der angewandten Labmenge äquivalent und 1 ccm des zweiten Serums entspricht 2,1 Dosen des Labs. Die beobachteten Werte der ersten Reihe sind Mittelwerte von drei, die der zweiten Reihe von zwei verschiedenen Messungen.

Die Tatsache, daß die Neutralisation des Antikörpers aus normalem Serum ganz anderen Gesetzen folgt, als die für das durch Immunisation erzeugte Antilab gelten, ist ein sicherer Beweis dafür, daß diese zwei Antikörper tatsächlich verschiedene Substanzen sind. Das war auch schon deshalb wahrscheinlich, weil das Antilab viel leichter durch Hitze zerstört wird als der Antikörper aus normalem Serum.[1])

Das Vorkommen vieler Antikörper im normalen Serum führte Ehrlich auf die Annahme, daß die Tiere allgemein Antikörper gegen verschiedene Toxine produzieren und daß die Einspritzung des Toxins in die Venen des Tiers diese Produktion nur vermehrt. Mit anderen Worten, die Antikörper in normalem Serum sollten mit den durch aktive Immunisation erzeugten identisch sein. Das ist beim Antilab offenbar nicht der Fall. Auch sonst sprechen viele Gründe gegen Ehrlichs Hypothese, wie Bashford in einer ausführlichen Kritik gezeigt hat.[2])

In einem Punkte kann ich Bashford nicht beistimmen. Er nimmt an, daß das Toxin, d. h. hier das Lab, sich zwischen dem normalen Serum und dem Rest der Flüssigkeit verteilt. Das ist ungefähr dieselbe Vorstellung wie bei Biltz. Nach Bashford müßten von seinem zweiten Serum, von dem 0,3 ccm die Hälfte des Labs aufnehmen, 0,6 ccm nötig sein, um $^2/_3$ wegzunehmen, indessen nehmen sie 78 % weg, 0,9 sollten 75 % aufnehmen, die Tabelle gibt 88, 1,2 ccm sollten 80 % aufnehmen, dagegen beobachtet 91 %.

Die zweite Serie (S. 181) kann nach Biltz' Schema berechnet werden, und gibt einen nahezu konstanten Wert des Exponenten p, nämlich $p = 2{,}3$ (vgl. S. 142), die erste Serie mit normalem Pferdeserum dagegen gibt einen mit wachsendem n stetig wachsenden Wert von p. Zwischen $n = 0{,}1$ und $n = 0{,}4$ ist $p = 0{,}85$, zwischen $n = 0{,}4$ und

[1]) Dieses Kriterion für sich allein gibt keinen sicheren Anhalt, denn die Thermostabilität eines gelösten Stoffes kann ziemlich stark von der Gegenwart anderer Substanzen, wie Salzen und Proteiden, beeinflußt werden. Vgl. Biernacki, Zeitschr. f. Biologie 28, (1891).

[2]) Bashford, Journal of pathology 8, 62 (1902).

Digitized by Google

$n = 1{,}0$ bekommen wir $p = 1{,}5$, zwischen $n = 1{,}0$ und $n = 1{,}5$ ist $p = 2{,}4$ und für höhere Werte von n ergibt sich p zu 3,3.

Wenn wir die Vorstellung von Biltz auf die Bindung von Lab und Antilab anwenden, so finden wir zunächst die Konzentration des Labs im Serum konstant annähernd gleich $n = 0{,}6$, während sie in der Flüssigkeit in dem Verhältnis 6:1 sinkt, was offenbar unmöglich ist, p wäre denn unendlich. Zwischen $n = 0{,}6$ und 0,7 geht p durch den Wert 11, und sinkt zwischen $n = 0{,}8$ $n = 0{,}9$ auf 5,3.

In einer sehr ausführlichen Abhandlung haben Fuld und Spiro[1]) es wahrscheinlich gemacht, daß das im Serum des Pferdeblutes enthaltene Antilab ein sogenanntes „Pseudoglobulin“ [2]) ist, dessen Wirkung darauf hinausläuft, daß es einen Teil der Calciumionen bindet und so die Koagulation verhindert oder besser verzögert. Wie wir gesehn haben (vgl. S. 49) hat die Konzentration der freien Calciumionen genau denselben Einfluß auf die Koagulationszeit wie die Konzentration des Labs. Daher hat eine Bindung der Calciumionen in einem bestimmten Verhältnis dieselbe Wirkung wie eine Neutralisation des Labs im selben Verhältnis. In diesem Falle regelt die Menge des Parakasein-Calciumsalzes die Geschwindigkeit der Koagulation. Die Salze des Calciums mit Parakasein und mit Pseudoglobulin müssen sehr wenig dissoziert sein und der Einfachheit halber nehmen wir an, daß der Dissoziationsgrad der beiden Salze und der beiden Säuren in Gegenwart einer gegebenen Menge Calciumionen ein solcher ist, daß wir das Guldberg-Waagesche Gesetz anwenden können. Das kann wenigstens als eine erste Annäherung so lange angenommen werden, bis die Eigenschaften der beteiligten Verbindungen untersucht sind. Wir nehmen nun die Menge des Calciumparakaseates in Abwesenheit von Serum als Einheit — man kann sie der Menge anwesenden Calciums, wenn sie nicht über eine gewisse Grenze hinausgeht, nahezu äquivalent setzen —. Jetzt setzen wir n Äquivalente Pseudoglobulin zu, dann haben wir im Gleichgewicht $(n - x)$ Äquivalente Pseudoglobulin, $(1 - x)$ Äquivalente Calcium-Parakaseat, x Äquivalente Pseudoglobulin-Calciumsalz und $(a + x)$ Äquivalente Parakasein, wo a die Menge freien Parakaseins für $n = 0$ ist. Dann gehorcht das Gleichgewicht der Gleichung:

$$(n - x)\,(1 - x) = x \cdot x\,(a + x).$$

[1]) Fuld und Spiro, Zeitschr. f. physiol. Ch. 31, 147 (1900).

[2]) Bei der Fällung mit Ammoniumsulfat bleiben Euglobulin und Pseudoglobulin in Lösung. Das Euglobulin hat einen koagulierenden Einfluß auf Kasein. Das Pseudoglobulin verzögert die Koagulation, die von Papayotin, Cynarase und Euglobulin hervorgebrachte sowohl, wie die von Lab.

Digitized by Google

Wenn a groß ist, d. h. bei Gegenwart von viel Kasein, können wir $(a + x)$ als konstant ansehn und haben dann die Gleichung, mit Hilfe deren die berechneten Werte gefunden sind. Wir dürfen daher sagen, daß die Vorstellung von Fuld und Spiro von den Versuchen gestützt wird, und es ist leicht zu sehn, wie sie noch strenger geprüft werden könnte.

Auch gegen die Koagulation des Blutplasmas gibt es einige natürliche Antikörper, darunter das Hirudin, enthalten im Blutegelextrakt, dessen Wirkung man seit langen Zeiten kennt. Fuld und Spiro[1]) ließen 0,4 ccm Extrakt aus Gansmuskel auf 1 ccm Gansplasma wirken und bestimmten die Menge „freien Muskelextraktes" $q_{beob.}$ in Gegenwart von n ccm eines Blutegelextraktes.

Neutralisation von Gänsemuskelextrakt durch Hirudin.

n	$q_{beob.}$	$q_{ber.}$
0	100	100
0,2	75	82
0,4	66,7	64,9
0,8	35,7	36,0
1,6	11,1	11,2

Die Berechnung ist mit Hilfe derselben Formel durchgeführt wie die Berechnung des Einflusses von Pferdeserum auf Lab. 1 ccm der Hirudinlösung ist der angewandten Menge (0,4 ccm) Extrakt äquivalent und die Konstante ist $x = 0{,}09$. Die Übereinstimmung ist sehr befriedigend. Es scheint daher recht natürlich, anzunehmen, daß die Wirkung von Hirudin auf die Gerinnung des Blutplasmas von derselben Art ist, wie die Wirkung von Pseudoglobulin auf die Gerinnung des Kaseins.

Die Tatsache, daß die Substanzen, die wir in diesem Teil der Chemie betrachten, nicht nur mit ihren spezifischen Antikörpern, sondern auch mit anderen Verbindungen reagieren, besonders auch mit so wohlbekannten wie Säuren, Basen, Salze oder auch Lecithin und Cholesterin, verspricht viel für die Zukunft. Denn wenn es nur Reaktionen mit spezifischen Antikörpern gäbe, die wir wenig Hoffnung haben in reinem Zustand, in dem sie genauerer Durchforschung zugänglich sind, zu erhalten, so hätten wir wenig Aussicht auf einen schnellen Fortschritt dieses Teiles der Wissenschaft.

Außer den koagulierenden Fermenten gibt es eine andere Gruppe Präzipitine, die diesen Namen mehr verdienen, nämlich solche, die durch Injektion proteidhaltiger Flüssigkeiten in lebende Tiere erzeugt

[1]) Fuld und Spiro, Hofmeisters Beiträge 5, 181 (1904).

Digitized by Google

werden. Unter diesen ist das Laktoserum, das durch Injektion von Milch in Tiere erzeugt wird, von P. T. Müller[1]) sehr gründlich untersucht worden. Andere Präzipitine, dargestellt durch interperitoneale Injektion von Eieralbumin und von normalem Pferdeserum in Kaninchen, sind von Eisenberg[2]) untersucht worden. Sie verhielten sich sehr ähnlich wie das Laktoserum, das Müller durch interperitoneale Injektion von Milch in Kaninchen dargestellt hatte.

Schon Bordet[3]) machte auf die großen Unterschiede zwischen Lab und Laktoserum, die beide Milch (Kasein) zum Gerinnen bringen, aufmerksam. Das Koagulum von Lab ist viel voluminöser und gelatinöser als das von Laktoserum, dieses gibt ferner im Gegensatz zu Lab bei niedriger Temperatur (unter 20°) eine Fällung. Ferner wird Laktoserum erst durch halbstündiges Erhitzen auf 70° unwirksam, während eine 2prozentige Lablösung ihre koagulierende Wirkung bei 50° in weniger als fünf Minuten verliert (vgl. S. 57). Das Laktoserum wird auch durch Ammoniumsulfat viel leichter gefällt als Lab. Ein sehr wichtiger Punkt ist, daß Laktoserum kein Serumalbumen gibt. Eine Ähnlichkeit ist, daß in beiden Fällen die Anwesenheit von Calcium- oder Baryumsalzen zur Präzipitation nötig ist, so daß Oxalate in der Milch den Prozeß hindern. Müller untersuchte andere Salze, nämlich NaCl, KCl, NH_4Cl, Na_2HPO_4, $NaCH_3CO_2$, $NaNO_3$, KNO_3, KJ, KBr, KSCN, und $MgSO_4$, aber keines konnte die Kalksalze ersetzen. Hierin zeigt sich ein großer Unterschied gegen die Agglutination, die nach Versuchen von Friedberger[4]) durch die verschiedensten Salze ermöglicht wird (vgl. S. 103). Die von Eisenberg untersuchten Präzipitine scheinen keiner Salze zu ihrer Wirkung zu bedürfen, viele Salze verringern die Wirkung schon in ziemlich schwacher Lösung, so z. B. verhindern $(NH_4)_2SO_4$ in 0,25-normaler Lösung und $MgCl_2$ in 2-normaler Lösung die präzipitierende Wirkung vollständig. Wenn die Milch einige Zeit auf 100° oder das Eieralbumin 60 bis 90 Minuten auf 78° erhitzt wurde, so ging ihre Fähigkeit, präziptiert zu werden, verloren. Müller behauptet, daß durch Zusatz von Kalksalzen die Präzipitabilität der Milch durch Laktoserum wieder herstellt, und daß sie nicht verschwand, wenn die Milch von Natur aus viel Kalksalze enthielt. Konzentrierte Lösungen von Harn-

---

[1]) P. T. Müller, Archiv f. Hygiene 44, 126 (1902). Zentralblatt f. Bakteriologie usw. 32, 521 (1902) und 34, 48 (1903).

[2]) Eisenberg, Bull. de l'Ac. des Sciences de Cracovie 1902 S. 289.

[3]) Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur, 13, 241 (1899).

[4]) Friedberger, Zentralblatt f. Bakteriologie 30, 341 (1901).

Digitized by Google

stoff oder Formalin zerstörten ebenfalls die Präzipitabilität von Eieralbumin sowohl wie die Agglutinibilität der Bakterien.

Das Präzipitat einer Mischung von Milch und Laktoserum löst sich in einer 1 prozentigen NaCl-Lösung. Diese Lösung wird sowohl von Lab wie von Laktoserum niedergeschlagen, genau wie eine Kaseinlösung. Die Behandlung mit Lab ergab sogar Serumalbumen. Offenbar ist der Niederschlag etwas löslich und seine Lösung teilweise in die zwei Komponenten dissoziert. Bei hoher Temperatur zersetzt sich das Laktoserum und neue Mengen entstehen durch Spaltung des löslichen Anteiles des Niederschlages, bis dieser vollständig in Kasein zurückverwandelt ist. Müller konnte das Laktoserum aus dem Präzipitat auch durch vorsichtige Behandlung mit Essigsäure isolieren. Die saure Lösung stand 2 Stunden in Berührung mit dem Präzipitat, wurde dann abgeschleudert und enthielt eine merkliche Menge Präzipitin. Die Verbindung von Laktoserum und Kasein kann durch plötzlichen Zusatz von Essigsäure gefällt werden. Der Niederschlag löst sich nach Neutralisation vollständig wieder auf, wird aber durch kleine Mengen Calciumsalz gefällt. Die Verbindung existiert daher wahrscheinlich in Lösung, aber in teilweise dissozierten Zustand und gibt mit Calcium- oder Baryumsalzen unlösliche Produkte. Parakasein, dargestellt durch Einwirkung von Lab auf Milch, bindet das Laktoserum nicht.

Laktoserum, das 30 Minuten lang auf 70° erhitzt worden ist gewinnt die merkwürdige Eigenschaft, die Präzipitation von Kasein' mittels Laktoserum zu hindern. Ebenso fand Eisenberg, daß sein Präzipitin für Eieralbumin nach einstündiger Erhitzung auf 72° in ein Antipräzipitin verwandelt war. Ebenso verlieren auch die Präzipitine gegen Cholera und Typhus, die durch Injektion von Kulturen der entsprechenden Bakterien in die Venen eines Pferdes hergestellt sind, ihre Eigenschaft ähnliche Kulturen zu präzipitieren durch Erhitzung auf ungefähr 60° während 30 Minuten,[1]) und sie gewinnen durch Erhitzen auf 73° antikoagulierende Eigenschaften (gegen Choleraserum).

Auch bei Agglutininen haben Eisenberg und Volk ähnliche Beobachtungen gemacht. Durch verschiedene Versuche wurde Müller zu dem Schlusse geführt, daß sich das Präzipitin mit dem Kasein vereinigt und eine in Gegenwart von Calciumsalzen lösliche Verbindung damit gibt. Auch Antipräzipitin kann den Niederschlag in derselben Weise auflösen, wie eine nicht zu schwache Säure ein Karbonat

[1]) Pick, Hofmeisters Beiträge 1, 81.

Digitized by Google

löst. Eisenberg zeigt das auf eine einfache Art, indem er einmal eine Mischung von Präzipitin und Antipräzipitin mit Eieralbumin, ein zweites Mal eine Mischung von Antipräzipitin und Eieralbumin mit Präzipitin mischt. Im zweiten Falle entstand kein Präzipitat, wohl aber im ersten, weil im zweiten Falle das Eieralbumin von dem Antipräzipitin gebunden worden war. (Die Reaktionsgeschwindigkeit ist offenbar ziemlich niedrig, sonst hätten die beiden Versuche dasselbe Resultat geben müssen.) Ähnliche Versuche machte Eisenberg mit koagulierendem Serum gegen Typhuskulturbouillon. Die Antipräzipitine stammen von den Präzipitinen her, denn wenn diese aus dem Serum ausgefällt sind (z. B. aus Laktoserum mittels Milch), so entstehen bei Erhitzung keine Antipräzipitine mehr; auch normales Serum gibt kein Antipräzipitin.

Die Bindung von Präzipitin an Kasein ist infolge der geringen Löslichkeit der Verbindung nahezu vollständig, wenn die beiden Substanzen in äquivalenten Mengen anwesend sind. Wenn eine von beiden in der Flüssigkeit im Überschuß ist, so wird sie zum großen Teil von dem Präzipitat mitgerissen. Das gilt insbesondere von dem Präzipitin. Die präzipitierbare Substanz ist einem anderen störenden Einfluß unterworfen, der besonders bei Eieralbumin hervortritt und Analogien mit dem Verhalten von Agglutininen und Serumpräzipitinen hat. Ein Überschuß von Eieralbumin löst die Fällung auf, so daß man häufig beobachtet hat, daß eine gegebene Menge Präzipitin mit einer schwachen Eieralbuminlösung eine Fällung gibt, nicht aber mit einer starken. Auch bei Kasein läßt sich diese Eigentümlichkeit beobachten, wie Müllers spätere Versuche zeigen. Die Menge des von einer gegebenen Menge Laktoserum erzeugten Niederschlages wächst daher zuerst mit der zugesetzten Menge Kasein, erreicht ein Maximum in der Nähe des Punktes, wo Kasein und Laktoserum einander äquivalent sind, um darauf wieder abzunehmen und 0 in einem Punkte zu erreichen, wo die Kaseinmenge annähernd doppelt so groß wie beim Maximum ist. Die Bestimmungen scheinen nicht genau genug zu sein, um mehr als eine annähernde Schätzung zu gestatten.

Einige Versuche von Eisenberg geben eine Vorstellung von der Konkurrenz zwischen Präzipitin und Antipräzipitin. Die Mengen sind in Tropfen angegeben, das Antiserum war erhitztes und in dem Verhältnis 1 zu 5 verdünntes Präzipitin. A ist die Menge des Eieralbumins, B die des Präzipitins, C die des Antipräzipitins, D der Rest der Flüssigkeit, bestehend aus physiologischer Salzlösung. Die gesamte Menge ist immer nahezu gleich 60 Tropfen.

Digitized by Google

Konkurrenz zwischen Präzipitin und Antipräzipitin.

A	B	C	D	beob.	P
1	0,6	0	58	Fäll.	0,6
1	1,2	1	56	keine	0,38
1	3	1	55	Fäll.	0,6
1	12	5	42	keine	0,55
1	30	5	24	Spur	0,75
1	53	5	1	Fäll.	0,84
1	44	15	0	keine	0,59
3	3	15	39	keine	0,27
10	3	15	32	Fäll.	0,9

Die Resultate können unter der Annahme berechnet werden, daß das Antipräzipitin doppelt so stark wie das Präzipitin ist, d. h. ein Tropfen Antipräzipitin die doppelte Äquivalentzahl enthält, wie ein Tropfen Präzipitin, und daß das Eieralbumin gleichmäßig pro Äquivalent verteilt wird. Dann kann die gebildete Präzipitinmenge P nach der Formel berechnet werden:

$$P = \frac{B}{B + 2C} \cdot A.$$

Ich habe diesen Ausdruck berechnet und in der Tabelle unter P aufgeführt. Man bemerkt, daß Fällung beobachtet ist, wenn P gleich oder größer wie 0,6 ist, keine, wenn es kleiner ist.

Die Fällung von Eieralbumin ist in verdünnten Säuren und Basen löslich, in Chlornatriumlösungen dagegen, selbst in konzentrierten, unlöslich. Die saure Lösung läßt den Niederschlag bei Neutralisation fallen. Beim Erhitzen koaguliert er und verliert seine Löslichkeit in schwachen Säuren. Hierin unterscheidet er sich von Laktoserum-Niederschlag und von agglutinierenden Bakterien, die bei hoher Temperatur die Agglutination verlieren. Er ist löslich in konzentrierten Lösungen von Harnstoff, Magnesiumchlorid und Formalin. Darin ist er den agglutinierten Bakterien ähnlich.

Von großer praktischer Wichtigkeit ist die Untersuchung von Serumpräzipitinen, die man durch Injektion des Serums eines Tieres in die Venen eines anderen Tieres bereitet. Diese Präzipitine sind durchaus spezifisch und sind daher in der forensischen Medizin angewandt worden, um den Ursprung von Blutflecken festzustellen. Betreffs dieses Punktes mag es genügen, die Untersuchungen von Uhlenhuth,[1]) Wassermann und Schütze[2]) und Hamburger[3]) zu zitieren.

[1]) Uhlenhuth, Deutsche med. Wochenschrift 1901, Nr. 30, S. 499.
[2]) Wassermann und Schütze, Berliner klin. Wochenschrift 1901.
[3]) Hamburger, Deutsche med. Wochenschrift 1905, Nr. 6.

Digitized by Google

In neuerer Zeit hat Hamburger[1]) einige quantitative Versuche über die Wirkung dieser Präzipitine durchgeführt. Er maß das Präzipitat, das sich bei der Reaktion zwischen einer bestimmten Menge eines Blutserums und seines Antikörpers bildete. Der Antikörper war durch wiederholte Injektionen dieses Serums in die Venen eines anderen Tieres dargestellt. Die aufeinander reagierenden Flüssigkeiten wurden in einem trichterförmigen Gefäße gemischt, das in eine kapillare Röhre von gleichmäßigem Querschnitt endigte, die in 100 Teile geteilt war. Dieses Gefäß wurde 1,5 bis 2 Stunden kräftig zentrifugiert, wodurch die Fällung in die kapillare Röhre getrieben wurde, und dort schließlich ein konstantes Volumen einnahm, das mit Hilfe der Teilung gemessen wurde.

Eine Versuchsreihe wurde mit Serum (A) aus Pferdeblut und Serum (B) aus einem Kalb, das mehrmals mit Pferdeserum behandelt worden war, ausgeführt. Das Pferdeserum war mit seinem 50fachen Volumen einer 1prozentigen Chlornatriumlösung verdünnt. Wenn zu einer bestimmten Menge, 1 ccm, des Kalbserums zunehmende Mengen des Pferdeserums (A) zugesetzt wurden, so erschien zuerst kein Niederschlag, darauf, bei höherer Konzentration von A nahm die Menge des Niederschlages nahezu proportional der Menge von A zu, bis ein Maximum erreicht war. Von da ab verursachten weitere Zusätze von Pferdeserum eine Abnahme des Niederschlages, bis bei einer bestimmten Grenze der Niederschlag verschwand. Dieses Verhalten, das bei Reaktionen zwischen Seren und ihren Präzipitinen sehr häufig auftritt, ist in den folgenden Zahlen sehr deutlich zu erkennen.[2]) Das gesamte Volumen (100 Teilstriche) des kapillaren Rohres betrug 0,04 ccm. Der Niederschlag ist daher in der folgenden Tabelle in Einheiten von 0,0004 ccm gegeben, entsprechend einem Teilstrich. Wenn 1 ccm Kalbserum gleich 100 Einheiten gesetzt wird, entsprechend der aus den Versuchen hervorgehenden Tatsache, daß es im Maximum 100 Einheiten des Präzipitats P geben konnte, und wenn aus analogen Gründen 1 ccm des verdünnten Pferdeserums gleich 300 gesetzt wird, so wird 1 ccm A äquivalent mit 3 ccm B. Daraus scheint hervorzugehen, daß aus A ein großer Teil der Eiweißstoffe in den Niederschlag geht, aus B aber nur ein kleiner Teil.

---

[1]) Hamburger, Folia haematologica Bd. 2 Nr. 8, 1905.

[2]) Hamburger und Arrhenius, Proc. of the meeting of the R. Ac. of Sciences in Amsterdam, 26. Mai 1906, S. 33.

Digitized by Google

Einwirkung verschiedener Mengen (A) Pferdeserum auf eine gegebene Menge (100) Kalbserum.

A	Vol.	$P_{beob.}$	$P_{ber.}$	A	Vol.	$P_{beob.}$	$P_{ber.}$
4	1,013	0	0,2	79	1,267	51	53,6
8	1,027	3	3,9	88,3	1,294	55	57
15	1,05	10	10,3	90	1,3	57	57,5
24	1,08	17	17,8	100	1,333	59	58,9
30	1,1	21	23,6	115,4	1,385	55	57,4
39	1,13	32	29,7	137	1,457	50	51,3
45	1,15	34	34	167	1,557	43	41,3
54	1,18	43	40,1	214	1,713	25	26,8
60	1,2	45	43,9	300	2	5	5,5
75	1,25	53 51	51,9	500	2,67	2	0

Das Maximum wird bei A gleich 100 erreicht, d. h. bei Zusatz von 0,333 ccm Pferdeserum, derjenigen Menge, die dem vorhandenen Kalbserum äquivalent ist. (Diese Beobachtung bedeutet tatsächlich die Bestimmung der äquivalenten Mengen zweier Seren.)

Die berechneten Zahlen, die innerhalb der Beobachtungsfehler mit den beobachteten Werten übereinstimmen — die Größe des Beobachtungsfehlers kann man aus der Differenz zwischen den zwei Beobachtungen für A = 75 abschätzen — sind folgendermaßen gefunden. Die Menge B des Kalbserums (hier B = 100) mag mit A Äquivalenten Pferdeserum reagieren. Dann wird eine bestimmte Menge Präzipitat, P_1, gebildet, von der p Teile in 1 ccm löslich sind. Der Rest, $P_1 - pV = P$, wird in das kapillare Rohr hineingetrieben (V = das Volumen der Mischung). Dann befinden sich in der Lösung noch $A - P_1$ Äquivalente Pferdeserum und $B - P_1$ Äquivalente Kalbserum. Nun zeigt der Versuch, daß ein weiterer Zusatz von Pferdeserum den Niederschlag auflöst. Wir wollen annehmen, daß Y Äquivalente der löslichen Verbindung gebildet werden, so daß ein Äquivalent davon ein Äquivalent Niederschlag und n Äquivalente Pferdeserum enthält (oder mit anderen Worten n + 1 Äquivalente Pferdeserum und 1 Äquivalent Kalbserum). Dann sind in Lösung folgende Mengen vorhanden, gerechnet in Äquivalenten der verschiedenen Substanzen:

$$[A - P - pV - (n+1)Y] \text{ Pferdeserum}$$

$$[B - P - pV - Y] \text{ Kalbserum}$$

und folgende Gleichgewichtsgleichungen gelten:

$$[A - P - pV - (n+1)Y]\,[B - P - pV - Y] = \varkappa_1 p^m V^2$$

$$[A - P - pV - (n+1)Y]\,p = \varkappa_2 Y.$$

Digitized by Google

Wenn wir Y aus der letzten Gleichung bestimmen und in die erste einsetzen, so erhalten wir:

$$(A-P-pV)\left(1-\frac{(n+1)\,p}{\varkappa_2+(n+1)\,p}\right)(B-P-pV$$
$$-\frac{(A-P-pV)\,p}{\varkappa_2+(n+1)\,p})=\varkappa_1 p^m V^2$$

p ergibt sich aus den Versuchen zu 3,5. Wenn wir $\frac{\varkappa_2}{p}+n+1=3{,}45$ und $\varkappa_1 p^m \frac{\varkappa_2+(n+1)p}{\varkappa_2}=130$ setzen, so finden wir die berechneten Werte für die Gesamtmenge Q des Niederschlages. $P_{ber.}$ ist gleich Q/V, der Menge des Niederschlages in 1 ccm.

Die letzte Gleichung gibt $\frac{\varkappa_1}{\varkappa_2}\frac{p^{m+1}}{0{,}29}=130$. Wenn wir annehmen, daß m = 1 ist, d. h. daß sich ein Molekül des Niederschlages aus je einem Molekül seiner beiden Bestandteile bildet, so erhalten wir $\frac{\varkappa_1}{\varkappa_2}=3{,}08$, wenn wir m = 2 setzen, finden wir $\frac{\varkappa_1}{\varkappa_2}=\frac{3{,}08}{p}=0{,}879$. Diese beiden Annahmen betreffs m dürften die wahrscheinlichsten sein. Im ersten Falle sind die beiden Reaktionskonstanten von derselben Größenordnung, im zweiten Falle ist $\varkappa_2$ von derselben Größenordnung wie $\varkappa_1 p$. Da weiter $n=2{,}45-\varkappa_2/p$ und $\varkappa_2/p$ einen positiven Wert hat, so kann n nur gleich 1 oder 2 sein (wenn wir gebrochene Zahlen außer acht lassen). Das wahrscheinlichste ist daher, daß die lösliche Verbindung des Niederschlages mit dem wirksamen Teile des Pferdeserums sich aus einem Molekül Präzipitat und einem oder zwei Molekülen des anderen Bestandteils aufbaut.

In einigen Fällen braucht man nicht anzunehmen, daß der Niederschlag durch fortgesetzten Zusatz des Serums, das eingespritzt worden war, wieder aufgelöst wird. Ein sehr interessantes Beispiel dieses Verhaltens gibt Hamburger. Es handelt sich um die Wirkung des Serums eines Kaninchens, das mit Schafserum behandelt war, auf die Seren dreier verschiedener Tiere, Schaf, Ziege und Rind, die so nahe miteinander verwandt sind, daß sie alle Niederschläge mit dem erwähnten Kaninchenserum geben. Wie natürlich, gibt das Schafserum den voluminösesten Niederschlag, demnächst kommt das Serum der Ziege, die mit dem Schaf am meisten verwandt ist, und die geringste Menge Niederschlag gibt das Serum des Rindes, das weniger nah mit dem Schaf verwandt ist, als die Ziege. Die Zahlen sind in den folgenden drei Tabellen gegeben. Das Kaninchenserum wurde durchgehends in der Menge von 0,4 ccm angewendet.

Digitized by Google

Wirkung von 0,4 ccm Serum eines mit Schafserum immunisierten Kaninchens auf Schafserum (A).

Menge von A		V^2	Menge des Niederschlages	
ccm	Äquiv.		beob.	ber.
0,02	0,8	0,162	1	0,5
0,04	1,6	0,163	2	1,3
0,1	4	0,25	3	3,5
0,15	6	0,302	6	5,3
0,2	8	0,36	7	7,2
0,6	24	1	21	21,5
1	40	1,96	35	34
1,5	60	3,61	39	48
2	80	5,76	60	57
3	120	11,56	67	66
5	200	29,2	64	65
7	280	54,8	58	58
10	400	108,2	49	46
15	600	237	10	19
18	720	338	5	3
20	800	416	2	0
1 (+ 1 ccm aq)	400	5,76	28	25
5 (+ 1 ccm aq)	200	41	57	51
10 (+ 1 ccm aq)	400	130	41	32

Die Menge des Niederschlages ist in Teilstrichen des kapillaren Rohres gegeben (100 Teilstriche = 0,04 ccm). Das Schafserum war normales Serum, verdünnt mit seinem 49 fachen Volumen 1 prozentiger Chlornatriumlösung. — Die Ziegen- und Rindseren der beiden folgenden Reihen waren ebenfalls in dieser Weise verdünnt. — Die Versuche wurden folgendermaßen berechnet: 1 ccm Schafserum ist 40 Einheiten des Niederschlages äquivalent. Die Anzahl solcher Äquivalente Schafserum ist in der zweiten Kolumne gegeben. Ebenso enthalten 0,4 ccm Kaninchenserum 120 solche Äquivalente, d. h. 1 ccm enthält 300 Äquivalente. Wenn nun das Volumen V ist, ursprünglich A Äquivalente Schafserum und 120 Äquivalente Kaninchenserum vorhanden waren, und P Äquivalente Präzipitat gebildet sind, so sind die Konzentrationen der zwei Seren $(A - P)/V$ und $(120 - P)/V$ und die Formel des Gleichgewichtes ist:

$$(A - P)\,(120 - P) = \varkappa \cdot V^2$$

wo $\varkappa$ eine Konstante ist, die sich aus den Versuchen zu 250 bestimmt. Mit Hilfe dieser Formel sind die berechneten Werte von P gefunden, die neben die beobachteten gesetzt sind. Bei den drei letzten Versuchen war dem Gemisch der Seren 1 ccm Wasser, enthaltend 1 %

Digitized by Google

Chlornatrium, zugesetzt worden, worauf bei der Berechnung des Volumens V Rücksicht genommen werden mußte.

Die Übereinstimmung zwischen den beobachteten und den berechneten Werten kann als sehr befriedigend betrachtet werden, besonders in Hinsicht auf die gewaltige Änderung von A (in dem Verhältnis 1:1000) und V^2 (1:2500).

Die einfache Form der Gleichgewichtsgleichung beruht auf der äußerst geringen Löslichkeit des Niederschlages in Kaninchenserum (noch nicht 1 Teil in 3000) und in Schafserum. Wahrscheinlich sind diese beiden Tatsachen miteinander in Zusammenhang.

Die mit Ziegenserum erhaltenen Zahlen wurden ebenso behandelt und die Resultate sind unten gegeben. Hier war 1 ccm des Ziegenserums wieder 40 Einheiten des Niederschlages äquivalent, aber 0,4 ccm des Kaninchenserums waren nur 85 Einheiten des Niederschlages äquivalent.

Wirkung des Serums eines mit Schafserum immunisierten Kaninchens auf Ziegenserum (A).

Menge von A		V^2	Menge P des Präzipitates	
ccm	Äquiv.		beob.	ber.
0,02	0,8	0,162	1	0,4
0,04	1,6	0,163	2	1,2
0,1	4	0,25	4	3,4
0,15	6	0,3	5	5,2
0,2	8	0,36	6	7
0,6	24	1	16	21
1	40	1,96	26	32
1,5	60	3,61	30	43
2	80	5,76	35	48
3	120	11,56	40	51
5	200	29,2	50	47
7	280	54,8	52	40
10	400	108,2	34	27
12	480	154	27	18
15	600	237	9	5
18	720	338	8	0
20	800	416	4	0
1 (+ 1 ccm aq)	40	5,76	21	22
5 (+ 1 ccm aq)	200	41	48	35
10 (+ 1 ccm aq)	400	130	30	17

Die Konstante $\varkappa$ ist gleich 200 gesetzt. Hier ist die Übereinstimmung nicht so vollkommen wie in der vorhergehenden Reihe. Die letzten Zahlen der Reihe würden viel besser stimmen, wenn wir $\varkappa = 160$ gesetzt hätten, aber dann würde der erste Teil der Reihe

Digitized by Google

größere Abweichungen zeigen. Vielleicht rührt diese Schwierigkeit von einer verschiedenen Löslichkeit des Niederschlages in Kaninchenserum und in 1 prozentiger Chlornatriumlösung her. Vielleicht ist auch eine Temperaturdifferenz für die schlechte Übereinstimmung der beiden Teile der Reihe verantwortlich zu machen. Tatsächlich ist es der schwache Punkt dieser Messungen, daß die Temperatur während der Zentrifugierung nicht kontrolliert werden kann. Auf alle Fälle kann aber kein Zweifel sein, daß die Erscheinung in der Hauptsache nach unserer Formel verläuft.

Dies gilt noch mehr für die Versuche mit Rinderserum, die in folgender Tabelle dargestellt sind. 1 ccm dieses Serums enthält 40 Äquivalente, 0,4 ccm des Kaninchenserums nur 35 Äquivalente. x wurde gleich 85 gefunden.

Wirkung des Serums eines mit Schafserum immunisierten Kaninchens auf Rinderserum (A).

Menge von A		V^x	Menge P des Präzipitates	
ccm	Äquiv.		beob.	ber.
0,02	0,8	0,162	1	0,5
0,04	1,6	0,163	2	1,3
0,1	4	0,25	4	3,4
0,15	6	0,30	5	5,2
0,2	8	0,36	7	6,7
0,6	24	1,00	16	19
1	40	1,96	20	24
1,5	60	3,61	22	26
2	80	5,76	25	26
3	120	11,56	28	25
5	200	29,2	22	21
7	280	54,8	10	17
10	400	108,2	7	11
12	480	154	5	7
15	600	237	3	1
18	720	338	2	0
20	800	416	1	0
1 (+ 1 ccm aq)	40	5,76	16	15
5 (1 ccm aq)	200	41	13	16
10 (+ 1 ccm aq)	400	130	5	7

Die Übereinstimmung ist sehr befriedigend.

Die Schlüsse, die man aus diesen drei Reihen ziehen kann, sind recht interessant. Durch Injektion von Schafserum in das Blut des Kaninchens haben wir ein Antiserum erhalten, das im ccm 300 Äquivalente Präzipitin gegen Schafserum, 212 Äquivalente Präzipitin gegen Ziegenserum und nur 90 Äquivalente Präzipitin gegen Rinderserum

Digitized by Google

enthält. Alle diese drei normalen Seren enthalten 2000 Äquivalente im ccm. Ebenso und nahezu in derselben Proportion sinkt die Reaktionskonstante von 250 für Schafserum auf etwa 180 für Ziegen- und 85 für Rinderserum. Wahrscheinlich enthält das Schafserum außer der Hauptsubstanz einige andere, die auch in den Seren der Ziege und des Rindes vorhanden sind, und nach Injektion in die Venen des Kaninchens Antikörper gegen diese Seren erzeugen, wenn auch in geringerer Menge, als das Präzipitin, das von der Hauptsubstanz des Schafserums erzeugt wird. Die Beobachtungen führen zu dem Schlusse, daß wir in dem Kaninchenserum eine Mischung von drei verschiedenen Präzipitinen vor uns haben. Sonst wäre schwer zu verstehn, daß jedes der drei normalen Seren von Schaf, Ziege und Rind im ccm dieselbe Anzahl (2000) Äquivalente des gebildeten Niederschlages enthält. Da 100 Äquivalente ein Volumen von 0,04 ccm einnehmen, würden die von 1 ccm Kaninchenserum erzeugten Niederschläge 0,24 ccm ausfüllen, wovon wahrscheinlich nur ein kleiner Teil aus dem Serum selbst und der größte Teil aus den zugesetzten Antiseren herstammt.

Die Versuche führen zu dem Schluß, daß die Präzipitine in dem Niederschlag wirklich gebunden sind und nicht als katalytische Agenzien wirken. Die Wirkung der Agglutinine zeigt eine große Ähnlichkeit mit der der Präzipitine, so daß es auch hier richtig scheint, eine wirkliche chemische, nach stöchiometrischen Verhältnissen verlaufende und nicht eine katalytische Reaktion anzunehmen. Ferner haben wir beobachtet, daß auch hämolytische Substanzen, wie Tetanolysin, an die Substanz gebunden werden, auf die sie wirken, so daß eine gegebene Menge Hämolysin nur einer bestimmten äquivalenten Menge Erythrocyten den Farbstoff entziehen kann (vgl. S. 73). Auch bei den Agglutininen ist eine solche Äquivalenz beobachtet worden. Es ist ein Hauptzug der Ehrlichschen Theorie, daß sie die Wirkung der Gifte als auf einer Bindung oder wie er oft sagt „Verankerung" des Giftes an das Substrat beruhend ansieht. — Hier geht Ehrlich sogar etwas zu weit, indem er z. B. annimmt, daß der Immunkörper, der von einem Erythrocyten absorbiert wird, darin „verankert" wird.

Ferner haben wir überall gefunden, daß bei der Neutralisation eines Giftes oder einer analogen Substanz durch einen Antikörper eine wirkliche Bindung nach stöchiometrischen Verhältnissen stattfindet. Es sei hier bemerkt, daß in einigen Fällen — und sie scheinen ziemlich häufig zu sein (vgl. S. 176) — wie z. B. der Gerinnung des Kaseins, die wirksame Substanz tatsächlich nicht eine

Digitized by Google

einfache ist, sondern aus zwei besteht, hier Lab und Calciumion. Der Antikörper, z. B. aus normalem Pferdeserum, bindet nur den einen Bestandteil der wirksamen Masse (hier die Calciumionen), während er das Lab (wahrscheinlich) intakt läßt. In ähnlichen Fällen ist es sehr wohl möglich, daß der Teil, der von dem Antikörper nicht gebunden wird, als Katalysator wirkt. Das scheint bei Lab sehr wahrscheinlich, da die zur Gerinnung erforderliche Zeit seiner Menge innerhalb weiter Grenzen umgekehrt proportional ist.

Im ganzen aber gewinnen wir aus dem eingehenden Studium dieser Erscheinungen den Eindruck, daß die katalytische Wirkung nicht die überwiegende Rolle spielt, die ihr von manchen Autoren oft zugeschrieben worden ist. Auf alle Fälle hatte Ehrlich recht, wenn er wiederholt die Notwendigkeit betonte, die Beziehungen zwischen Toxinen und Antitoxinen nach den allgemeinen Prinzipien der physikalischen Chemie zu erforschen.[1])

In den vorliegenden Blättern habe ich zu zeigen versucht, daß die physiko-chemischen Gesetze, die die chemischen Reaktionen im allgemeinen beherrschen, auch auf die Reaktionen der durch Immunisation hervorgebrachten und ähnlicher Substanzen ihre Anwendung finden können. Wie bekannt, spielt der osmotische Druck in diesen Gesetzen eine wichtige Rolle. Durch die Diffusionsversuche wird gezeigt, daß die betreffenden Substanzen einen osmotischen Druck ausüben. Daher schien es sehr wahrscheinlich, daß die Geschwindigkeiten der Reaktionen, an denen diese Substanzen teilnehmen, dieselben Regelmäßigkeiten aufweisen, die für andere Reaktionen gefunden sind, und die mit dem osmotischen Druck nahe zusammenhängen In der Tat finden wir eine große Anzahl der verschiedensten und lehrreichsten Beispiele für Reaktionsgeschwindigkeiten verschiedener Ordnung, für den Einfluß der Temperatur, von Reaktionsprodukten sowie von fremden Stoffen auf diese Geschwindigkeiten. Wir dürfen wohl sagen, daß die hier untersuchten Erscheinungen auch vom allgemein physiko-chemischen Standpunkt wegen ihrer Vielfältigkeit und Regelmäßigkeit die größte Beachtung verdienen.

Da die Gesetze der chemischen Gleichgewichte aus denen der Reaktionsgeschwindigkeiten abgeleitet werden können, dürfen wir erwarten, diese Gesetze, besonders das von Guldberg und Waage

[1]) vgl. Ehrlich, Rapport au 13. Congres international de medecine, Paris, 2—9 Aout 1900, section de bacteriologie. Schlußbetrachtungen in Nothnagels spezieller Pathologie und Therapie, Bd. 8, S. 6—7, Wien 1901. Bericht über die Tätigkeit des Institutes für Serumforschung zu Steglitz S. 19, Jena 1899 (G. Fischer). — Über Toxine und Antitoxine in Therapie der Gegenwart, 1901.

Digitized by Google

in den Reaktionen dieses Gebietes der Chemie herrschend zu finden. Die detaillierte Untersuchung dieser Frage, die in den fünf letzten Kapiteln enthalten ist, scheint die Berechtigung dieser Auffassung auf das überzeugendste darzutun. Alle Erscheinungen dieser Art, die der Gegenstand einer quantitativen Durcharbeitung geworden sind — und ich freue mich, feststellen zu können, daß das experimentelle Material hier nicht kleiner als das auf Reaktionsgeschwindigkeiten bezügliche ist — haben sich innerhalb der Grenzen der Messungsgenauigkeit diesen Gesetzen des Gleichgewichts untergeordnet. Manchmal komplizieren sekundäre Wirkungen, wie der Danysz-Effekt, die Erscheinungen, aber auch in diesen Fällen haben sich die allgemeinen Regeln als durchführbar erwiesen.

So habe ich meinen Beitrag zu der Diskussion der Frage geliefert, ob die allgemeinen physiko-chemischen Gesetze auf die Reaktionen der besprochenen Substanzen anwendbar sind, eine Frage, die von der Frankfurter Schule und ihren Anhängern kategorischst verneint worden ist. Mir will scheinen, daß zur Entscheidung, ob ein quantitativ formuliertes Naturgesetz richtig ist, quantitative Messungen, mit der größten erreichbaren Genauigkeit ausgeführt, notwendig sind, worauf man prüft, ob sie sich in die mathematische Formulierung des diskutierten Gesetzes einfügen. Wenn sie es tun, bleibt nur noch übrig, die Folgerungen der gefundenen Regelmäßigkeit zu diskutieren. Die Verkündung allgemeiner Sentenzen, wie daß die untersuchten Substanzen Kolloide sind und daher den für andere Substanzen gefundenen allgemeinen Gesetzen nicht unterworfen sein können, oder daß die in der Biochemie untersuchten Reaktionen so außerordentlich kompliziert sind, daß man sich unmöglich vorstellen kann, daß sie allgemeinen, so einfachen Gesetzen gehorchen, oder daß zu viele verschiedene Substanzen zugleich anwesend sind, um überhaupt eine Regelmäßigkeit erwarten zu lassen; solche allgemeine Aussprüche haben gegenüber dem eindeutigen Resultate der quantitativen Untersuchung keine Bedeutung. Ich hoffe daher, daß die Gegner der Anwendung der besprochenen allgemeinen Gesetze es für notwendig halten werden, ihre Ansichten durch quantitative Messungen zu stützen, und die Entwicklung der wissenschaftlichen Behandlung dieses Gebietes wird den größten Nutzen davon haben.

Digitized by Google

Namenregister.

Aberson 90, 92.
Armstrong 36—39, 41.
Arrhenius 9, 10, 18, 19, 30, 44, 65, 73, 97, 110, 119, 124, 125, 131, 151, 171, 189.

Bang 175.
Barendrecht 35.
Bashford 1, 134, 161, 165, 178, 179, 182.
Bayliss 51, 52, 107.
Bechhold 102—105, 109.
Behring 20, 99, 118.
Besredka 1.
Biernacki 182.
Biltz 24, 98, 99, 101, 107, 141, 142, 151, 182, 183.
Blum 174.
Bodenstein 36, 40.
Bomstein 4, 5.
Bordet 14, 22, 23, 98, 143, 145, 147, 151, 158, 159, 161, 162, 166—170, 177, 185.
Borissow 80, 81.
Bossaert 109.
Bredig 33, 99, 105.
Brodie 19.
Brown 35, 37, 38.
Bruck 16.
Buchner 20, 91, 143.

Calcar 130, 131.
Calmette 12, 13, 20.
Cherry 13, 17, 20.
Claussen 88.
Cohen 88.
Connstein 83.
Craw 18, 19.

Danysz 15, 124—127, 197.
Detre 157, 158.
Dreyer 21, 129.
Duclaux 34, 35, 38, 108, 172, 173, 176.
Dungern 2, 124, 127, 149.

Ehrlich 7—10, 13, 14, 20, 21, 99, 116, 120, 122, 124, 129—132, 134, 143, 148, 151, 161, 162, 168—171, 178, 179, 182, 195, 196
Eisenberg 22, 23, 77, 93—95, 185, 186, 187.
Engel 82.
Euler 33, 91, 92.

Famulener 14, 26, 27.
Fischer, E. 106.
Freundlich 105.
Friedberger 161, 185.
Ford 168.
Fuld 47, 50, 60, 183, 184, 187.

Gay 145, 166—168, 170.
Gengou 177.
Gessard 2.
Girard-Mangin 107.
Glendinning 37.
Godlewski 88.
Gruber 144, 149, 151.
Guldberg 1, 19, 115, 142, 183, 196.

Hamburger 188, 189, 191.
Hammarsten 2, 47, 174, 175, 181.
Hanriot 84.
Hardy 101.
Hausmann 178.
Hedin 174.
Hemmeter 175.
Henderson Smith 68.
Henri 34—37, 39, 40, 52, 54, 69, 90, 91, 92, 101, 107.

Digitized by Google

Hertwig 89.
Herzog 91.
Hildebrand 2.
vant Hoff 19, 24, 64, 88.
Hoyer 83.
Huppert 45, 46.

Jacoby 178.
Joos 23, 95, 100.
Jörgensen 3, 10, 12, 60.

Kanitz 88.
Kastle 84.
Kitasato 20.
Kjeldahl 35, 64, 79, 87.
Klein 167.
Kobert 179.
Kossel 8, 106.
Kraus 108, 178.
Kyes 137—141, 157.

Lalou 54.
Landois 142.
Landsteiner 23.
Laqueur 174.
Largnier des Bancels 52, 54.
Loeb, J. 89, 90, 105, 107.
Loeb, L. 177.
Lörcher 174.
Loevenhart 84.
Ludwig 178.

Madsen 1, 3—5, 7, 9, 10, 12, 14—16, 18, 19, 21, 22, 26, 27, 29, 31, 47, 50, 51, 56—61, 63, 65, 68, 70, 72, 73, 75, 87, 98, 100, 101, 110, 118, 119, 121 bis 125, 127—135, 137, 139, 158, 180, 181.
Malkoff 96.
Malloisel 107.
Manwaring 150.
Marshall 124.
Martin 13, 17, 20.
Matthaei 88.
Metschnikoff 1, 151.
Mett 80, 87, 92.
Meyer, H. 16.
Morgenroth 1, 21, 23, 24, 50, 97, 98, 124, 130, 139, 143—145, 149—151, 160—165, 168—171, 175, 180.
Much 24, 98, 99.

Müller, P. T. 124, 185—187.
Müller von Berneck 33.
Myers 178.

Neißer 124, 146—148.
Nernst 19, 24, 96, 99.
Nicloux 85, 86.
Nicolle 108.
Noguchi 15, 70, 72, 73, 135, 137.

Ostwald 44, 121, 174.
O'Sullivan 39.

Pasteur 91.
Pauli 105—107.
Pawlow 47, 50, 81, 175.
Peter 89.
Pfeiffer 161.
Portier 127.

Ransom 7, 16, 95, 144.
Reichel 48.
Reid 17.
Richet 127.
Ritchie 30.
Röden 2, 181.
Römer 131.
Roux 20.

Sachs 2, 19, 24, 124, 138, 141, 142, 145, 146, 149, 151, 157, 158, 160, 162—165, 170, 171.
Sackur 174.
Sawjalow 47, 50, 79, 80, 175.
Schmidt, A. 177.
Schmidt, G. 98, 191.
Schmidt-Nielsen 175.
Schütz sen. 44, 47, 53, 56, 79—81.
Schütz jun. 44—46.
Schütze 2, 188.
Segelcke 46.
Sellei 157, 158.
Siebert 24, 98, 99.
Siedentopf 173.
Sjöqvist 41, 42, 44, 45, 51, 52, 79, 80, 82, 106, 107.
Snyders 89.
Soxhlet 47.
Spiro 48, 183, 184.
Spohr 64.
Stade 81, 82.
Storch 46.

Digitized by Google

Tammann 32, 39, 64, 65, 84.
Terroine 30, 39, 46.
Tompson 39.
Tyndall 173.

Uhlenhuth 188.

Vaillant 120.
Vaubel 174.
Volhard 81.
Volk 77, 93—95, 186.

Waage 1, 19, 115, 142, 183, 196.
Walbum 7, 14, 16, 22, 50, 51, 56, 58—62, 70, 72, 73, 75, 87, 101, 121, 123, 131, 133, 134, 139, 180, 181.
Warder 65.
Wartenberg 83.
Wassermann 8, 13, 16, 168, 188.
Wechsberg 124, 146.
Weigert 7, 169.
Weis 55.
Zeller 85.

Digitized by Google

Sachregister.

Ablenkung des Alexins 146—149, 160.
Abrin 1, 178.
Absorption 22, 77, 93 u. f.
Adrenalin 16.
Adsorption 22, 24, 98, 99, 141, 151.
Agglutinine, Agglutination 3, 7, 12, 22, 68, 69, 76, 77, 93 u. f., 143, 185, 186, 195.
Agglutinoid 101.
Albumin 41—45, 52, 60, 61, 64, 65, 79, 80, 81, 104—108, 123, 124, 172, 179, 187, 188.
Albuminpräzipitin 60, 61.
Albumose 43, 50, 104—107.
Alexin 14, 23, 32, 143 u. f., 161 u. f.
Alkalien, Hämolyse durch 65, 66, 72—74, 109 u. f.
Alopecie 129.
Alkoholbildung aus Zucker 90, 91, 93.
Amanita muscaria s. Fliegenpilz.
Amboceptor s. Immunkörper.
Ammoniak, Hämolyse durch 11, 65—68, 70—74, 92, 110, 112, 114 u. f.
Amphotere Elektrolyte 106.
Amygdalin 39, 54, 55.
Ancistrodon piscivorus s. Wasserlanzenschlange.
Antialexin 161 u. f.
Antiantitoxine 161, 162.
Antiimmunkörper 161, 162.
Antikörper, Bildung und Zerfall 3 u. f.
Antitoxine, Zerstörung mit der Zeit 31.
Antitoxine, Diphtherie usw., s. die betr. Toxine.
Assimilisation 65, 88, 89, 93.
Atmung der Pflanzen 88, 89, 93.

Bacillus Coli 68, 98, 108.
Bacillus megatherium 18.
Bacillus pyocyaneus 13, 56.
Bakteriolysine 6, 12, 75, 109 u. f.
Bariumsalze 173—178, 185.
Bimolekulare Reaktionen 25.
Blutegel 184.
Blutplasma 176, 177, 184.
Boletus scaber 33.
Borsäure 114 u. f.
Botulismusgift 100, 158.
Brillenschlange s. Cobra.

Calciumkaseat 174, 175.
Calciumparakaseat 183.
Calciumsalze 48, 49, 173, 174—178, 183, 185, 196.
Chlorophyll 65, 88, 89.
Choleraagglutinin 3, 4, 93—96.
Choleraprăzipitin 186.
Choleravibrionen 3, 4, 93—96, 108, 109.
Cholesterin 7, 8, 15, 95, 96, 101, 122, 123, 135, 136, 141, 142, 144, 158, 181, 184.
Chymosin 175, 179.
Cobragift 7, 23, 78, 124, 137—141, 156 bis 159, 179.
Cobralecithid 140, 141, 156, 157.
Coliagglutinin 56, 59, 64, 76, 77, 92, 98.
Crotalusgift 132, 137, 139, 140, 178, 179.
Crotin 178, 179.
Cyklamin 179.
Cynarase 2.
Cytoplasma 85.

Diastase 34, 37.
Dibrombernsteinsäure 64, 65.
Diffusion der Toxine und Antitoxine 16—19, 99, 130, 131.
Digitalin 179.
Diphtherietoxin 4, 7, 8, 10, 12, 17, 19, 21, 99, 118, 127—132, 142, 161.

Ei, Temperaturkoeffizient der Entwicklung 89, 93.
Eidotterfett 82, 92.
Emulsin 2, 32, 33, 37—39, 55, 64, 65.
Enzyme 2, 38—40.
Epitoxin 130.

Digitized by Google

Fermente 2, 33, 40, 41.
Fette, Verseifung der 41, 55, 65, 81—86, 92, 93.
Fibrin 177.
Fibrinferment 2, 60, 176, 177.
Fliegenpilz 85.
Fluoride 176, 177.

Gärung 90—92.
Gansmuskelextrakt 60, 184.
Gansplasma 184.
Gelatine 46, 50—54, 56, 64, 81.
Giftstärke, Messung der 8, 9.
Gleichgewichtkonstante, Veränderlichkeit der, 132, 133.
Gleichgewicht von Alexin und Immunkörper 151 u. f.

Hämolyse, Hämolysine 6, 10, 11, 31, 32, 65 u. f., 92 u. f.
Harnstoff 186, 188.
Hefe 90, 91, 93.
Herzschläge (Einfluß der Temperatur auf die Häufigkeit) 89, 90, 93.
Hirudin 184.
Hundeserum, normales 69.
Hydrolyse 65.
Hypnotoxin 127.

Immunisierung, passive und aktive 4, 143, 160.
Immunkörper 13, 14, 23, 32, 97, 98, 143 u. f., 161 u. f.
Immunserum 143, 161 u. f.
Intrakardiale, -muskulare, -peritoneale, -venöse Injektion 5, 21, 132.
Invertin 34, 35, 38, 39, 64.
in vitro und in vivo Reaktionen 10, 11, 134, 179.

Kaninchenserum, norm. 14, 135, 140, 155, 159, 181.
Kasein 49, 51—54, 64, 87, 92, 172—176, 180—187, 196.
Katalase 33, 34.
Katalyse 25, 33, 38, 64, 65, 146, 195, 196.
Koagulation 12, 108, 109, 172 u. f.
Kohlensäure-Assimilation 88, 93.
Kolloid de bœuf 171.
Kolloide 24, 98, 99, 101, 105, 107, 172, 173.
Komplement s. Alexin.

Lab 1, 12, 27, 46—50, 57, 58, 64, 124, 172—176, 179—187, 196.
Laktase 2, 37—39.
Laktoserum 185—187.
Lebensprozesse, Abh. von der Temperatur 88—93.
Lecithin 7, 137, 139, 140, 156 u. f., 184.
letale Dose 8—10.
Leukocyten 176, 177.
Lipolyse s. Fette.

Magenextrakt 81, 82.
Magensaft 50, 81—83, 92.
Magnesiumsalze 174.
Maltase 35—37, 39.
Maltose 35—37, 39.
Malzextrakt 55.
Meerschweinchen, normales 8.
Meerschweinchenserum, normales 13, 152 u. f.
Merkurichlorid 76, 92, 109, 157, 158, 178, 179.
Milch 185, 186.
Milchgerinnung 46—50, 64, 172—187.
Milchzucker 37—40.
Molekulargewicht der Toxine und Antitoxine 17.
Morphin 1.
Muskelextrakt 60.

Naja tripudians s. Cobra.
Natriumoleat 75, 76, 92.
Natronhydrat, Hämolyse durch 11, 65, 67.
Neutralisation 109 u. f.

Ölsäure 74, 75.
Oleinderivate 74, 75, 91, 109.
Optimen 48, 78, 86, 100, 101.
Oxalate 176, 177, 185.

Pankreasferment 2, 50—53.
Pankreatinextrakt 82.
Papayotin 50.
Parakasein 175, 183, 186.
Paresis 129.
Partialtoxine 116.
Pektase 178.
Pektin 178.
Pepsin 2, 41—47, 50, 52, 55, 58, 64, 79, 80, 81, 84, 107.

Digitized by Google

Pepton 43, 44, 50, 61—64, 104—106, 175.
Pestbazillen 108.
Pferdeserum, normales 2, 7, 108, 124, 136, 145, 181—185, 189, 190.
Physiologische Lösung 6, 167, 168.
Plasma 60, 176, 177.
Präzipitine 6, 12, 60, 61, 65, 109, 172 u. f.
Protein 55, 107, 123, 124.
Proteolytisches Ferment 15.
Prototoxoid 129, 131—133.
Pseudoglobulin 183, 184.
Pseudolösung 172, 173, 175.

Reaktionsgeschwindigkeit, allgemeine Gleichung der 24—26.
Ricin 1, 10, 15, 16, 31, 76, 92, 97, 124, 133—135, 160, 161, 178, 179.
Ricinnervengift 16, 134, 135.
Rinderserum, inaktiviertes 145, 170, 189 bis 195.
Rinderserum, normales 136, 142, 170, 181, 191—195.
Rizinusöl, Verseifung des 83, 84.
Rizinussamenenzym 83—86, 92, 93.
Robin 1.
Rohrzucker, Inversion des 34, 35, 38 bis 40, 64, 65.
Rohrzuckerlösung, physiologische 11.

Safranin 109.
Salicin 32, 55, 64.
Salze, Einwirkung auf die Agglutination 102—105.
Salze, Einwirkung der, auf die Hämolyse 112, 113, 123, 124.
Saponin 1, 7, 8, 15, 95, 101, 111, 135, 136, 142, 144, 158, 179.
Säuren, Hämolyse durch 72—74, 92, 112.
Schafserum 191—195.
Schlangengifte 12, 13, 137.
Seitenketten 120, 169.
Sensibilisation 149, 158.
Serobakterien 102—105.
Serum, inaktiviertes 143.
Serum, normales 2, 7, 68, 69, 96, 142, 143.
Serumalbumen 175, 176, 185.
Serumpräzipitin 187 u. f.
Solanin 1, 111, 179.
Spezivität der Agglutinine 96, 101, 107.
Staphylolysin 14, 15, 78, 122, 124.
Statistische Berechnungsmethode 9.
Steapsin 81.
Streptococcus pyogeneus 177.
Streptokokken 108.
Streptolysin 75, 92, 121, 122.
Strontiumsalze 173—178.
Subkutane Injektion 5, 21.
Sublimat s. Merkurichlorid.
Syntoxoid 132.

Taurocholat 111.
Tetanolysin 2, 7, 11, 12, 16, 17—20, 22, 27—31, 61—68, 75, 92, 97, 101, 109, 110, 117—129, 132, 133, 137, 142, 161, 167, 179, 180, 181, 195.
Tetanospasmin 16, 99.
Tetanusbazillen 108.
Thymolgelatine 46, 50, 51, 56.
Thyrosinase 2.
Toxoid 120, 129.
Toxon 130.
Transfusion 142.
Traubenzucker 90—93.
Triolein 75, 76.
Trypsin 2, 41, 50—56, 58, 59, 64, 81, 87, 92, 107.
Typhusagglutinin 4, 23, 76, 92—96.
Typhusbazillen 93—96, 102—105, 108, 109.
Typhuspräzipitin 186, 187.

Urease 2.

Vesuvin 109.
Vibriolysin 26—29, 64, 75, 92, 122.

Wasserlanzenschlange, Gift der 78, 138, 140.

Ziegenserum, normales 31, 96, 144, 155, 159, 191—195.
Zucker s. Milch-, Rohr- usw. Zucker.
Zymase 2, 91, 92.

Digitized by Google

Berichtigung.

Pag.	111	statt	Taurochlorat	lies:	Taurocholat.
„	199	„	vant Hoff	„	van't Hoff.
„	199	„	Röden	„	Rödén.

Roßberg'sche Buchdruckerei, Leipzig.

Digitized by Google

Digitized by Google

UNIVERSITY OF MICHIGAN
3 9015 07871 0244

Digitized by Google

Digitized by Google